

Akadémiai Doktori Értekezés

**ÚJ EREDMÉNYEK A ROVAR-NEUROPEPTID KUTATÁSBAN:
IZOLÁLÁSOK, MEGHATÁROZÁSOK ÉS HATÁSMECHANIZMUSOK**

Fónagy Adrien

a biológiai tudomány kandidátusa

MTA Növényvédelmi Kutatóintézete

Budapest, 2006

TARTALOMJEGYZÉK

I. BEVEZETÉS	- 3 -
II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	- 5 -
II/1. A rovarok neuroendokrin rendszere	- 5 -
II/2. A neuropeptidek szintézise, kibocsátódása	- 7 -
II/3. A neuropeptidek csoportosítása, nevezéktana	- 9 -
II/4. A fő neuropeptid csoportok bemutatása, egyes peptidek hatásmechanizmusának rövid áttekintése	- 10 -
II/4.(A) Növekedéssel és fejlődéssel kapcsolatos neuropeptidek	- 12 -
II/4.(B) Szaporodással kapcsolatos neuropeptidek	- 15 -
II/4.(C) Metabolizmust és homeosztázist befolyásoló neuropeptidek	- 17 -
II/4.(D) Izommozgásokat befolyásoló neuropeptidek	- 20 -
III. CÉLKITŰZÉSEK	- 21 -
1. rész: KÜLÖNFÉLE NEUROPEPTIDEK TISZTÍTÁSA, IZOLÁLÁSA, MEGHATÁROZÁSA MAMESTRA BRASSICAE-BŐL, VALAMINT KAPCSOLÓDÓ HATÁSVIZSGÁLATOK	- 22 -
IV. FEROMONOTROPIKUS NEUROPEPTIDEK	- 22 -
IV/1. Előzmények	- 22 -
IV/2. Anyag és módszer	- 26 -
IV/2/1. Felhasznált rovarok/törzsek	- 26 -
IV/2/2. Alkalmazott <i>in vivo</i> biotesztek a PT aktivitás vizsgálatára	- 26 -
IV/2/3. Agy-SOG komplex boncolása, szövet kivonás (<i>extrakció</i>) és előtisztítások	- 27 -
IV/2/4. HPLC elválasztás és tisztítás	- 28 -
IV/2/5. Szerkezet-meghatározás	- 28 -
IV/2/6. Kompetitív ELISA vizsgálatok	- 29 -
IV/3. Eredmények	- 29 -
IV/3/1. Alkalmazott <i>in vivo</i> biotesztek a PT aktivitás vizsgálatára	- 29 -
IV/3/2. A Mab-PT izolációja és meghatározása	- 30 -
IV/3/3. További Mab-PT-k kimutatása kompetitív ELISA-val	- 33 -
IV/4. Megvitatás	- 33 -
V. ADIPOKINETIKUS NEUROPEPTIDEK	- 37 -
V/1. Előzmények	- 37 -
V/2. Anyag és módszer	- 39 -
V/2/1. Felhasznált rovarok/törzsek	- 39 -
V/2/2. Alkalmazott <i>in vivo</i> biotesztek a metabolikus aktivitás vizsgálatára	- 40 -
V/2/3. A CC(CA) komplex boncolása, szövet kivonás (<i>extrakció</i>) és előtisztítások	- 41 -
V/2/4. HPLC elválasztás és tisztítás	- 41 -
V/2/5. Szerkezet-meghatározás	- 42 -
V/3. Eredmények	- 42 -
V/3/1. Alkalmazott <i>in vivo</i> biotesztek a metabolikus aktivitás vizsgálatára	- 42 -
V/3/2. A Mab/(Mas)-AKH neuropeptid izolációja és meghatározása	- 42 -
V/4. Megvitatás	- 46 -
VI. MIOAKTIV NEUROPEPTIDEK	- 47 -
VI/1. Előzmények	- 47 -
VI/2. Anyag és módszer	- 49 -
VI/2/1. Felhasznált rovarok/törzsek	- 49 -
VI/2/2. Alkalmazott <i>in vitro</i> bioteszt a mioaktivitás vizsgálatára	- 50 -
VI/2/3. Az agy-SOG boncolása, szövet kivonás (<i>extrakció</i>) és előtisztítások	- 50 -
VI/2/4. HPLC elválasztás és tisztítás	- 51 -
VI/2/5. Szerkezet-meghatározás	- 51 -

VI/3. Eredmények	- 51 -
VI/3/1. Alkalmazott <i>in vitro</i> biotest a mioaktivitás vizsgálatára	- 51 -
VI/3/2. Mioaktív neuropeptidek frakcionálása, biológiai hatásai és szerkezetük	- 51 -
VI/4. Megvitatás	- 53 -
2. rész: A FEROMON-BIOSZINTÉZISÉNEK HORMONÁLIS IRÁNYÍTOTTSÁGA ÉS A FOLYAMATOT KÍSÉRŐ SEJTTANI ESEMÉNYEK BEMUTATÁSA A BOMBYX MORI-BAN, VALAMINT A MAMESTRA BRASSICAE-BEN	- 55 -
2. rész Előzmények	- 55 -
VII. A PBAN HATÁSMECHANIZMUSA A B. MORI-BAN	- 59 -
VII/1. Előzmények	- 59 -
VII/2. Anyag és módszer	- 62 -
VII/2/1. Felhasznált rovar/törzs	- 62 -
VII/2/2. A <i>Bom-CaM</i> izolációja, meghatározása és jellemzése	- 62 -
VII/2/3. A <i>CaN</i> szerepének bizonyítása a <i>PBAN</i> jelátadási folyamatában	- 63 -
VII/2/4. A <i>bombykol</i> termelő <i>PG</i> sejtek azonosítása, izolálása és kultúrában tartása	- 64 -
VII/2/5. A <i>bombykol</i> termelő <i>PG</i> sejtek fluoreszcensz mikroszkópos vizsgálata, valamint jellegzetes sejtteni dinamizmusa és a folyamat <i>PBAN</i> általi befolyásoltsága	- 65 -
VII/2/6. A <i>bombykol</i> termelő <i>PG</i> sejtek ultrastrukturális vizsgálata, jellegzetes dinamikus folyamatok feltérképezése és leírása	- 67 -
VII/2/7. A <i>bombykol</i> termelő <i>PG</i> sejtek citoplazmatikus <i>LD</i> -k kémiai elemzése	- 67 -
VII/2/8. A citoplazmatikus <i>LD</i> -k non-destruktív izolálása további vizsgálatok céljából	- 69 -
VII/2/9. Az <i>Lf</i> -ek és <i>LTP</i> -k részleges elválasztása és tisztítása az általuk szállított zsírszerű anyagokkal összefüggésben	- 70 -
VII/3. Eredmények	- 72 -
VII/3/1. A <i>Bom-CaM</i> izolációja, meghatározása és jellemzése	- 72 -
VII/3/2. A <i>CaN</i> szerepének bizonyítása a <i>PBAN</i> jelátadási folyamatában	- 73 -
VII/3/3. A <i>bombykol</i> termelő <i>PG</i> sejtek azonosítása, izolálása és kultúrában tartása	- 76 -
VII/3/4. A <i>bombykol</i> termelő <i>PG</i> sejtek fluoreszcensz mikroszkópos vizsgálata, valamint jellegzetes sejtteni dinamizmusa és a folyamat <i>PBAN</i> általi befolyásoltsága	- 78 -
VII/3/5. A <i>bombykol</i> termelő <i>PG</i> sejtek ultrastrukturális vizsgálata, jellegzetes dinamikus folyamatok feltérképezése és leírása	- 83 -
VII/3/6. A <i>bombykol</i> termelő <i>PG</i> sejtek citoplazmatikus <i>LD</i> -k kémiai elemzése	- 87 -
VII/3/7. A citoplazmatikus <i>LD</i> -k non-destruktív izolálása további vizsgálatok céljából	- 91 -
VII/3/8. Az <i>Lf</i> -ek és <i>LTP</i> -k részleges elválasztása és tisztítása az általuk szállított zsírszerű anyagokkal összefüggésben	- 92 -
VII/4. Megvitatás	- 93 -
VIII. A PBAN HATÁSMECHANIZMUSA A M. BRASSICAE-BEN	- 100 -
VIII/1. Előzmények	- 100 -
VIII/2. Anyag és módszer	- 101 -
VIII/2/1. Felhasznált rovar/törzs	- 101 -
VIII/2/2. A <i>cAMP</i> szerepének <i>in vivo</i> vizsgálata a <i>PBAN</i> jelátadási folyamatában	- 102 -
VIII/2/3. A <i>cAMP</i> szerepének <i>in vitro</i> vizsgálata a <i>PBAN</i> jelátadási folyamatában	- 102 -
VIII/3. Eredmények	- 103 -
VIII/3/1. A <i>cAMP</i> szerepének <i>in vivo</i> vizsgálata a <i>PBAN</i> jelátadási folyamatában	- 103 -
VIII/3/2. A <i>cAMP</i> szerepének <i>in vitro</i> vizsgálata a <i>PBAN</i> jelátadási folyamatában	- 104 -
VIII/4. Megvitatás	- 106 -
X. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	- 112 -
XI. IRODALOM	- 113 -
XII. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	- 134 -

I. BEVEZETÉS

Az egy- és többsejtű élőszervezetek egységes belső egyensúly, –a homeosztázis– megteremtésére és annak megőrzésére törekszenek. Két, szorosan egymásra épülő rendszer, az idegi és endokrin-rendszer folyamatos kölcsönhatásának eredménye és valamennyi szereplője együtt és külön-külön is felelős, azért a harmóniáért, ami minden soksejtű állati szervezet, így a rovarok sajátja is. A rovarok valamennyi életfunkciójának és homeosztázisának hátterében is az idegi kontroll, ill. az ehhez kapcsolódó (neuro)-hormonok/peptidek állnak.

A rovar-neuropeptid kutatás új korszakba lépett, amikor immáron több mint 30 éve izolálták és szekvenálták az első rovar-neuropeptidet, a *proktolint* (Starratt és Brown, 1975). Mostani tudásunk és mikro-analitikai elválasztás technikai ismereteink, –elsősorban magasnyomású folyadékkromatográfiás (*HPLC*)–, valamint tömegspektrometriás (*MS*), továbbá immunanalitikai, újabban pedig molekuláris biológiai eszköztárunk lehetőségeivel szinte megmosolyogni való, hogy 125 kg, amerikai csótány (*Periplaneta americana*) nyersanyagból kiindulva, 180 µg tiszta *proktolint* –ezt, az egyébként a rovarokban igen általánosan előforduló pentapeptidet– sikerült kivonni. Az elválasztás nyomonkövetésének sikeressége, a hormon biológiai hatásának, pontosabban a csótány utóbél spontán izomműködést serkentő képességének volt köszönhető. A klasszikus hagyományokat követő rovar-neuropeptid kivonás, tisztítás, elválasztás, majd szerkezet meghatározás folyamatában még napjainkban is jelentős szerepük van az *in vivo* és/vagy *in vitro* rovar-bioteszt (*bioassay*) rendszereknek (Miller, 1980). Sok esetben már elégséges csupán 1-10-50 állatból (ideg)szövetmintát venni, majd néhánylépcsős eljárást (pl. kapilláris *HPLC*) követően, a minták mátrixközvetített lézereszorpció repülésiidő tömegspektrometriás (*MALDI-ToF MS*) vizsgálat alapján mintegy ujjlenyomat-szerűen le- és összeolvashatók a valószínűsíthető peptidszerkezetek. Ez a megközelítés voltaképpen már a peptidomika (kis proteinek vizsgálata) új tudományága, ami egy gyorseszt jellegű tájékozódást biztosít (Verhaert és mtsai., 2001). Igaz, a biológiai aktivitásra a megfelelő teljes bizonyosságot továbbra is a szintetikus változat(ok) dózis-hatás vizsgálatai jelentik.

Ismereteink a rovar-neuropeptidek primer struktúráját, szintézisüket, kibocsátódásukat, receptorhoz történő kötődésüket, és főleg szerkezet-hatás és hatásmechanizmusukat illetően drámai mértékben nőttek az elmúlt tíz esztendőben. A rovar-neuroendokrinológia fejlődésének köszönhetően –és ezzel egy időben– viszont még fokozottabbá vált az igény az új ismeretekre alapozott környezetkímélőbb növényvédelmi módszerek kifejlesztésére, majd alkalmazására, ami egyre több laboratóriumot készítet a rovarélettan területén ismereteik összegzésére a

kártevők minél hatékonyabb leküzdése érdekében. A cél azonban sohasem a teljes megsemmisítés, hanem sokkal inkább faj vagy csoport specifikus szabályozás, mely azonban csak akkor valósítható meg, ha a rovarélettan, -endokrinológia, -biokémia, valamint -ökológia legújabb eredményeit felhasználjuk. Miután a neuropeptidek kulcsfontosságú életfolyamatokat irányítanak a rovarok életében ezért ezek a specifikus anyagok, pontosabban természetes és/vagy szintetikus analógjaik, mimetikumaik, agonistáik vagy antagonistáik ígéretes jelöltként jöhetnek szóba a modern növényvédelmi stratégiák kidolgozásában is.

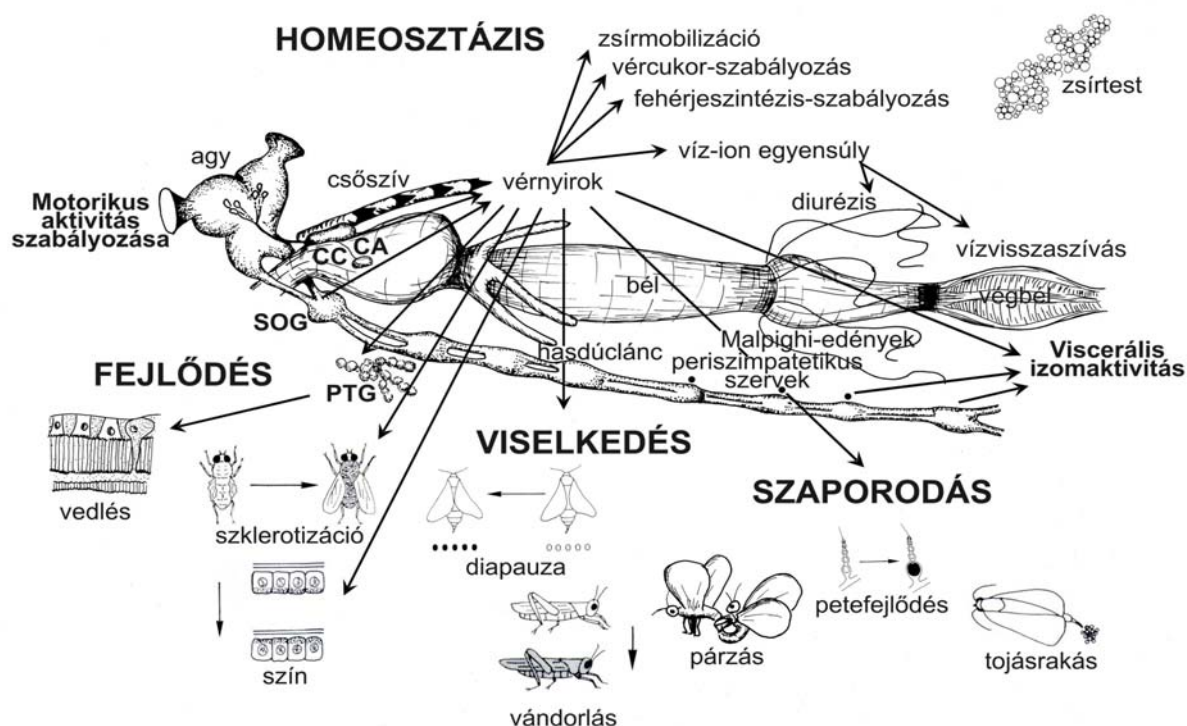
A rovar-neuropeptidek szerkezetének, részletes hatásmechanizmusának, élettani hatásainak, valamint az összefüggések minél pontosabb megismerése elengedhetetlenül szükséges mind az alap mind pedig az alkalmazott kutatások területén, melyek megszerzése megfelelő és megbízható biotesztek nélkül elképzelhetetlen. Modell rendszerek használata alapvető biológiai és orvos-biológiai történések tanulmányozására hosszú múltra tekintenek vissza, de főleg emlős szervezetekre korlátozódtak. Újabban, megfelelő kísérleti modelleket már a gerinctelenek, ill. a nem emlős gerincesek körében is keresnek (Scharrer, 1987). Megnőtt az érdeklődés az alacsonyabb rendűek irányába, a viszonylagos egyszerűségből, könnyebb hozzáférhetőségből és alkalmazhatóságból adódóan. A vizsgálatok eredményei feltűnő strukturális és élettani párhuzamokra mutatnak rá, akár a két állattörzs, az ízeltlábúak (köztük a rovarok), valamint a gerincesek között. Ezek az analógiák vonatkozhatnak mind a molekuláris, sejt, vagy akár szervezeti szintekre. A széles alapokon nyugvó összehasonlító tanulmányok ősi biológiai törvényszerűségekre hívják fel a figyelmet, és gyakran olyan szabályszerűségekre mutatnak rá melyeket csupán emlősökön vizsgálva, aligha fedezhetnénk fel. A rovar-biotesztek (élettani, biokémiai) segítségével tanulmányozhatjuk és megérthetjük, hogy egyes részek külön-külön hogyan alkotják meg a működő, harmonikus egészet.

A dolgozatban egyrésztől újabb rovar-neuropeptidek eredményes tisztítását és izolációját ill. meghatározását írom le káposzta bagolylepkéből (*Mamestra brassicae*; Noctuidae, Lepidoptera), valamint kapcsolódó hatásvizsgálatokat rovar-biotesztek alkalmazásával **(1. rész)**, másrésztől a selyemlepke (*Bombyx mori*; Bombycidae, Lepidoptera) feromonszintézisének folyamatát és sejtani eseményeit bemutató egyedülállóan részletes és kidolgozott modelljét ismertetem és kissé rövidebben, hasonlóan, a *M. brassicae*-ben **(2. rész)**.

II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

II/1. A rovarok neuroendokrin rendszere

Az egységes belső egyensúly, –a homeosztázis– megteremtésére és annak megőrzésére tekinthető az adott élőlény legmegfelelőbb válaszána a környezeti adottságokra vagy kihívásokra is (Downer és Laufer, 1983). Két, szorosan egymásra épülő rendszer, az idegi- és endokrin-rendszer folyamatos kölcsönhatásának eredménye és valamennyi szereplője együtt és külön-külön is felelős, azért a harmóniáért, ami minden soksejtű állati szervezet, így a rovarok sajátja is. A rovarok valamennyi életfunkciójának és homeosztázisának hátterében is az idegi kontroll, ill. az ehhez kapcsolódó (neuro)hormonok állnak, melyek fiziológiai folyamatok összességét, mint például a szaporodást, növekedést, fejlődést, izommozgásokat, vízháztartást, lipidek, szénhidrátok, fehérjék és speciális rovarhormonok mint a szeszkviterpén szerkezetű *juvenilhormonok*, (*JH*) (Williams, 1956) és a szteroid típusú *ekdizonok* (Butenandt és Karlson, 1954) anyagcseréjét befolyásolják (Fónagy, 2006a) (1. ábra).

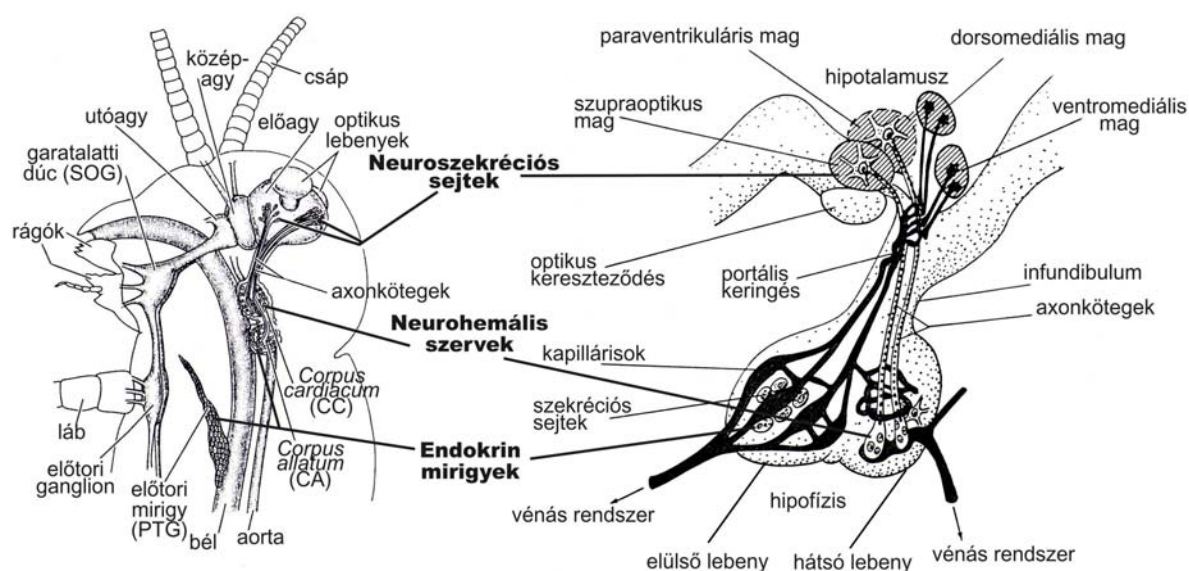


1. ábra: A (neuro)hormonok által irányított legfontosabb életfolyamatok a rovarokban.

(Cook és Holman, /1985/ nyomán kiegészítve és módosítva)

Kopeč a XX. sz. elején gyapjaslepke (*Lymantria dispar*) hernyóin végzett agy roncsolásos kísérletei alapján a rovarok metamorfózisáért és periodikusan bekövetkező vedléséért egy „agyi faktort” tett felelőssé (Kopeč, 1917; 1922). A 30-as évektől viszont, klasszikusnak számító rovar-endokrinológiai vizsgálatok eredményei alapján (extirpáció, szerv és szövet beültetések, ligáció, vércsírok transzfúzió stb.) már hormonokhoz kötöttek számos rovarélettani folyamatot, eseményt (Wigglesworth, 1934; Fraenkel, 1935). Wigglesworth vérszívó poloskán (*Rhodnius prolixus*) végzett úttörő munkásságával megindul a feltételezett hormonok, keletkezési helyének, majd dinamizmusuknak leírása, mint pl. metamorfózis „gátlásáért” felelős, a *Corpus allatum* (CA) mirigyben termelődő JH-ké (Wigglesworth, 1935).

Az idegi eredetű neuropeptideket a neuronok, bizonyos neuroszekréciós sejtek (Ns) termelik. Ez utóbbiak rendelkeznek az idegsejt összes jellemző morfológiai és funkcionális sajátosságával, de mirigysejtek módjára neurohormonokat szintetizálnak. E neuronok szerepét az endokrin rendszerrel való kommunikációban Ernst Scharrer (1928) vetette fel, amikor felfedezte egy csontos halban (*Phoxinus laevis*) azokat a sejteket, melyek a hipotalamo-hipofizeális rendszer részeit alkotják. A rovar-neuroendokrinológia hajnalát, sejttani értelemben, 1937-re tesszük, amikor Berta Scharrer madeira csótányokban (*Leucophaea maderae*) először írt le mirigyfunktiojú idegsejteket (Scharrer, 1937).



2. ábra: A rovarok (bal oldalon) és gerincesek (jobb oldalon) neuroendokrin rendszere. Az összehasonlító sematikus ábrán láthatók a legfontosabb neuroszekréciós sejtcsoportok (regulációs peptideket termelnek), neurohemális szervek (neuropeptideket tárolnak, kibocsátanak), valamint a hozzájuk szorosan kapcsolódó nem idegi eredetű endokrin mirigyek (hormonokat termelnek).

(Strand, /1999/ nyomán kiegészítve és módosítva)

A vázlatos rajzon látható (2. ábra), hogy az agyi neuroszekréciós központok (és/vagy garatalatti dúc /*Suboesophageal ganglion; SOG*/), –amelyekben az aktív anyagok keletkeznek– elsődleges nélkülözhetetlen részét képezik a szervrendszernek, melyek feltűnően hasonlóak mind szerkezet, mind funkció terén a rovarokban és a gerincesekben. A rendszer második része az agyon kívül elhelyezkedő neurohemális régió, ahol a neuroszekréta tárolódik, majd kibocsátódik. A *Ns* idegrostja végignyúlik a központi idegrendszeren, de a sejtre jellemző helyen áthatol a vér(nyirok)-agy gáton, így a szekréta a neurohemális területen a test-folyadékba ürül. Jól körülhatárolt rész esetén neurohemális szervről beszélünk (pl. *Corpus cardiacum /CC/*, periszimpatetikus szervek /*PSO*/; 1. ábra). A harmadik eleme, egy nem idegi eredetű, belső elválasztású mirigy, mely többnyire szorosan kapcsolódik az előzőhöz (pl. *CA*, előtori mirigy /*Prothoracic gland; PTG*/). Számos jól körülhatárolt endokrin sejt(csoport) található a rovarok középbéli hámsajtje között, fő funkciójuk az emésztéssel, felszívással, valamint izommozgásokkal hozhatók összefüggésbe. Eddig főleg lepkék hernyóiban találtak ún. *epitrachealis* mirigysejteket (a légcsövek légzőnyílásai közelében) és szekrétaik a vedlésnél játszanak szerepet. Megemlítendő, hogy pl. egyes kétszárnyú lárvák esetében a *CA-CC* és *PTG* egy ún. gyűrű miriggyé alakul.

A két nagy állattörzs közötti neuroendokrin hasonlóság a következőképpen mutatható be: A rovarok elülső agyában található páros *Ns*-ek a gerincesekben található hipotalamusz *Ns*-ekkel analógok. Az idegrostok belépnek a rovarok legfontosabb neurohemális szervébe –a *CC*-be-, mely a gerinces agyalapi mirigy hátsó lebenyének „felel meg”. A vérnyirokba (*haemolymph*) később nemcsak a tárolt anyagok jutnak el, hanem a *CC* saját „mirigysejtjeiben” termeltek is. További idegrost kötegek pedig belépnek a *CA*-ba, amely egy jellegzetesen rovar-endokrin mirigy, a gerinces agyalapi mirigy elülső lebenyével hozható párhuzamba. A rovarok esetében –ez az ún. kétlépcsős irányítási rendszer– két esetben figyelhető meg a maga teljességében: a *CA*-ban termelődő *JH*-k, ill. a *PTG*-ben termelődő vedlési hormon, az *ekdizon* esetében, ugyanis szintézisüket az agyi neuroszekréciós központokban termelődő –majd *CC*-ben tárolódó– regulációs peptidek befolyásolják (2. ábra). A gerincesekhez hasonlóan a rovarokban is sok (vagy még több is!) a neuropeptid, de ezek többnyire közvetlenül (egy lépcsőben) fejtik ki hatásukat.

II/2. A neuropeptidek szintézise, kibocsátódása

A neuropeptidek keletkezési helyeiről –a funkcionális egységek bemutatása révén– már fentebb is esett szó. Az előagy ún. *pars intercerebralis* régiójában található legnagyobb számban *Ns*-ek, de sokat azonosítottak az *SOG*-ban, ganglionokban, sőt *PSO*-kban is. Az

immuncitokémia, az *in situ* hibridizáció lehetőséget biztosítanak az adott peptidek keletkezési helyének/helyeinek pontos feltérképezésére, és az eredmények révén napjainkra szinte könyvtári irodalommal büszkélkedhetnek (Nässel, 1996; 2002). Arra is fény derült, hogy több esetben, egyetlen sejt(csoport) többféle, akár jelentősen eltérő szerkezetű neuropeptidet is termelhet. A dolgozat tárgyát a neuropeptidek termelődésének pontos lokalizációja, valamint kapcsolódó immuncitokémiai vizsgálatok nem képezik, így erről bővebben nem írok.

Az *Ns* dendrikus elágazása a ganglionok neuropiljében van, amelyben a szóma is található. Az itt szintetizált peptidek proteinekkel körülvett granulumokban vándorolnak az idegrostokban 5-20 mm/h sebességgel, amíg el nem éri az axon végződést vagy megfelelő ürülési helyet, ami finom elágazásokat alkot és vezikulumokkal teli. Ezeken az ún. szinaptoidokon keresztül a kibocsátás exocitózissal történik a vérnyirokba. A membrán eredeti méretét mikropinocitózissal nyeri vissza, biztosítva ezzel, hogy minimális extracelluláris folyadék jusson be a sejtbe. A kibocsátási aktivitást (ill. gátlás/serkentés) a *Ns* dendrikus elágazásán kapcsolódó más idegsejtek szinapszisai befolyásolják.

A peptidhormonok oligopeptidek (~10-20 aminosav) vagy kis fehérjemolekulák lehetnek (0,50-40 kD mólsúly között). Bioszintézisükről tudjuk, hogy egy-egy neurohormon egy gén termékének csak egy részét képezi és a prekursor molekula poszt-transzkripcionálisan, enzimatikusan feldarabolódik, módosul. Legegyszerűbb esetben, a *pre-prohormont* egy szignál peptid és az aktív neuropeptid alkotja, mint a vedlés egyes mozzanatait befolyásoló eklóziós hormon (*Ecdlosion hormone; EH*) esetében. Van, amikor egy nagyobb protein molekula végül csak egyetlen kisebb aktív peptidet, továbbá számos strukturálisan „közömbös” fragmentumot eredményez, mint például a lipid háztartásért felelős adipokinetikus hormonok (*Adipokinetik hormone; AKH*) szintézisének. Máskor, pl. egy csótányfaj (*Diploptera punctata*) esetében 13, részben különböző, a *CA* működését gátló allatosztatikus molekulát (*Allatostatin; AST*) azonosítottak. Végezetül pl. a selyemlepkében (*B. mori*) esetében a diapauzáért felelős hormon (*Diapause hormone; DH*), valamint az előbbihez részben hasonló feromon-bioszintézist serkentő hormon (*Pheromone Biosynthesis Activating Neuropeptide; PBAN*) egyetlen prekursorból származik, bár funkciójuk térben és időben jól elkülönül.

A neuroszekréta hormonként (vérnyirokba ürülnek és mivel vízben oldódnak, könnyen eljutnak a célszervig/-sejtig és távol fejt ki hatásukat), egyesek neuromodulátorként (lokális kibocsátás/hatás) vagy neurotranszmitterként (szinapszis) is működhetnek. Többek között, pl. jelentős neuromodulátor funkció a *proktolin*-ről is bebizonyosodott az idők folyamán. Ennek fordítottja is igaz, egyes biogén aminok (szerotonin, oktopamin) hormonként is kifejthetik hatásukat.

II/3. A neuropeptidek csoportosítása, nevezéktana

Az elmúlt bő tíz évben tárgyi tudásunk gyarapodásával **jelentősen szaporodtak ismereteink, ezért bátrabban és megalapozottabban vállalkozhatok korszerű csoportosításukra és bemutatásukra részben több összefoglaló revíziójával, valamint saját korábbi (Fónagy, 1994) és újabb eredményeim segítségével.** Röviden bemutatom, hogy milyen szempontok alapján csoportosítjuk, osztályozzuk a már ismert neuropeptideket, valamint azokat, melyeket pl. molekuláris biológiai eszközökkel előre jeleznek, valószínűsítene. Alapvetően funkció szerint osztályozzuk arovar-neuropeptideket, ami sok esetben szerkezeti hasonlóságot is jelent, de nem szükségképpen. **A közelmúltban megjelent tanulmányom alapján (Fónagy, 2005) a következő felosztás ajánlható, mely szerint a négy fő csoport a következő:** **Növekedéssel és fejlődéssel (A), valamint Szaporodással (B) kapcsolatos neuropeptidek** (Gäde és Hoffmann, 2005; De Loof és mtsai., 2001); **Metabolizmust és homeosztázist (C)** (Gäde, 2004), ill. **Izommozgásokat (D) befolyásoló neuropeptidek** (Schoofs és mtsai., 1994). Az alpontokban és az 1. táblázaton bemutatott peptidek természetesen csak a legfontosabbak, bővebb tájékozódást további még nagyobb összefoglalók biztosítanak (Holman és mtsai., 1990; Gäde és mtsai., 1997; Gäde, 1997).

Egy-egy azonosított neuropeptid, néha több megvizsgált funkció tekintetében is aktívnak bizonyul, tehát *pleiotropikus*. Ez a következőből fakadhat: egyrészt, egyes hasonló szerkezetű/végződésű (lsd. lentebb) neuropeptidek, mint tudjuk, térben és időben elkülönülnek (pl. *DH* és *PBAN*), de többféle (homológ /azonos fajból/ vagy heterológ /más fajból származó/) biotesztben hatásosnak bizonyulnak, másrészt pl. a spontán izommozgásra ható rovar *Kininek (K)* aktívan befolyásolják az emésztőrendszer viscerális izomsejtjeit (emésztési folyamat) és a *Malpighi*-edények mozgását (kiválasztási folyamat) is. Az eredmények akkor a legmeg-nyugtatóbbak, ha sikerül az adott peptid izolációja, azonosítása (majd szintézise), keletkezési helyének, transzportjának feltárása, a célszerven dózis-hatás, végezetül hatásmechanizmus vizsgálata (pl. posztembrionális fejlődés, lipidháztartás, feromon-bioszintézis, stb. endokrinológiája már sok részletét tekintve ismert).

A 80-as évek végére szükségessé vált az ismert neuropeptidek csoportosítása és nevezéktanának kialakítása. Ez utóbbi tekintetében Raina és Gäde (1988) által javasolt rendszer terjedt el, ami áll a rovar fajnév kezdőbetűiből ahonnan izolálták és egy funkció, vagy szerkezeti utalás rövidítésből: *Lom-AKH*, (és kiegészítő sorszámból: *Lom-AKH-I, II, III*), *Bom-PBAN*, *Lom-TK* stb. (*Lom*: *Locusta migratoria*; *Bom*: *Bombyx mori*; /újabbán használatos *Locmi* vagy *Bommo* stb. ötbetűs előtag is/ *AKH*: *Adipokinetic hormone*; *TK*: *Tachykinin*).

II/4. A fő neuropeptid csoportok bemutatása, egyes peptidek hatásmechanizmusának rövid áttekintése

A rovar-neuropeptid receptorait és hatásmechanizmusát tekintve még mintegy 10-12 éve is főleg közvetett és sok szempontból hiányos ismereteink voltak, mint azt az MTA Kandidátusi dolgozatomban is megfogalmaztam és leírtam (Fónagy, 1994). Azóta mind eszközeit, mind pedig szemléletét tekintve jelentős változások történtek, és az eredmények sem maradnak el. Az utóbbi időkben, a szerkezet-hatás *in vivo* és *in vitro* rovar biotesztekhez kapcsolódó vizsgálatoknak köszönhetően már nem csak farmakológiai értelemben rendelkezünk ismeretekkel a célszervekben található receptorokról (*r*), hanem a molekuláris biológia térhódítása miatt az alábbi, élettani szempontból is fontos receptorokat azonosítottak, izoláltak és írtak már le (a legfontosabbak közlési sorrendben): ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) *TKr* (*Tachykinin-like peptide*) (Li és mtsai., 1991); dohányyszender (*Manduca sexta*) *DPr* (*Diuretic peptide*) (Reagan, 1994); ecetmuslica *ASTr* (Birgül és mtsai., 1999), valamennyit ún. reverz fiziológiai megköze-lítéssel. Igazi áttörést, az első valódi rovar neuropeptid-receptor, az *AKHr* klónozása jelentette szintén ecetmuslicából és selyemlepkéből (Staubli és mtsai., 2002). Külön említendő a kukorica bagolylepke (*Helicoverpa/Heliothis/ zea*), *H. zea-PBANr* (Choi és mtsai., 2003) és a *B. mori-PBANr* (Hull és mtsai., 2004), ugyanis strukturálisan és funkcionálisan is különböznek (lásd lentebb; a két fajban eltérő a PBAN jelátadása/*signal transduction*/ és hatásmechanizmusa) annak ellenére, hogy a két fajban található *PBAN* C-terminális aktív szekvenciája (*FXPRLamid*, X=T;V;S) azonos és a két molekula között is nagyfokú azonosság van.

A csoportosításnak megfelelően általánosságban bemutatom a legismertebb rovar-neuropeptideket, (ld. 1. táblázatot is), de a dolgozat témájának megfelelően a *PBAN*, *AKH* ill. egyes mioaktív peptidekre vonatkozó részleteket az **1. rész** megfelelő fejezeteinek **Előzményeiben** ismertetem, míg az újdonságokat az **1. rész Eredmények** és **Megvitatás** külön fejezeteiben tárgyalom. Röviden áttekintem továbbá az egyes rovar-neuropeptid hatásmechanizmusát a fő csoportok bemutatása során, de tekintettel arra, hogy a *PBAN* jelátadási folyamata, valamint eltérő hatásmechanizmusa, két vizsgált fajban, a *B. mori*-ban és *M. brassicae*-ben az értekezés nagyobbik részét alkotják, így a területet a **2. rész Előzmények** fejezeteiben ill. a **2. rész Eredmények**, valamint **Megvitatás** megfelelő fejezeteiben ismertetem.

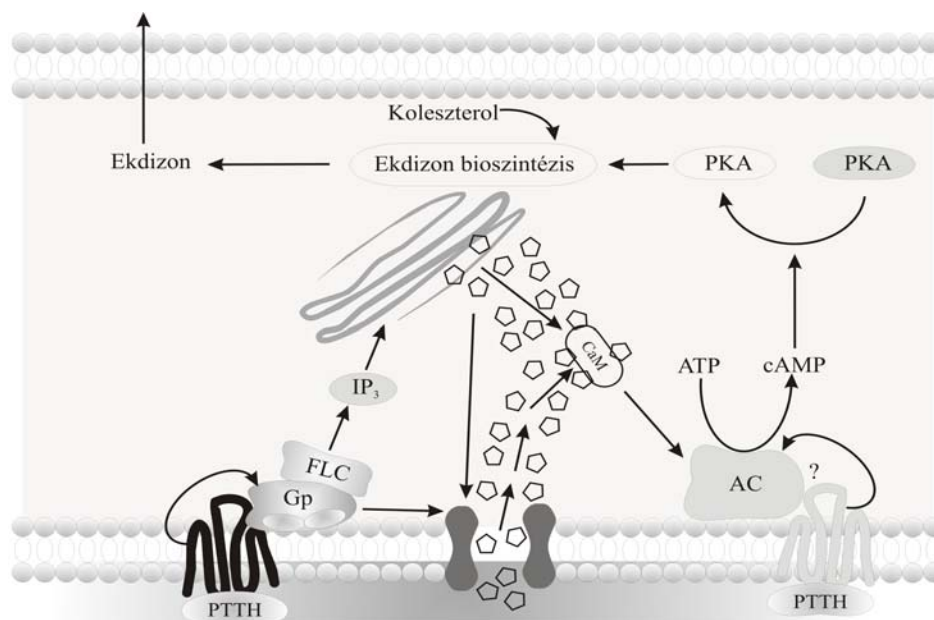
II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

	Neuropeptid	Elsődleges hatás	Szerkezet
Növekedés és fejlődés	Bom-PTTH (monomer)	Ekdizon bioszintézist serkenti az előtöri mirigyben	GNIQVENQAIPDPCTCKYKKEIEDLGENSEVPRFIETRN-CNKTQQPTCRPPYICK ESLYSITILKRRETQSLESLEIPNELKYRWVAESHPSVSVACLCTRDYQLRYNNN
	A lánc:Bombyxin-II A lánc:Humán inzulin	Glikogén, trehalóz csökken Vércukor szint csökken	GIVDECCLRPCSDVLLSYC GIVEQCCTSICSLYQLENYCN
	Mas-AT	JH szintézis serkentése	GFKNVEMMTARGFamid
	Mas-AST	JH szintézis gátlása	pQVRFRQCYFNPISCF
	Dip-AST-1=Pea-AST-1	JH szintézis gátlása	LYDFGLamid
	Dip-AST-2=Pea-AST-2	JH szintézis gátlása	AYSYVSEYKRLPVYNFGLamid
	Mas-EH	Vedlés részfolyamatait, a potroh motoros neuronjait serkenti	NPAIATGYDPMIEICIENCAQCKKMLGAWFEG-PLCAESCIKFKGKLIPECEDFASIAPFLNKL
	Bom-MRCH-I(=PBAN-I)	Melanin képződést serkenti	LSEDMPATPADQEMYQPDPEEMESRTRYFSPRLamid
	Bom-DH	Embriónális diapauzát indukál	TDMKDESDRGHAHSERGAFCFGPRLamid
Szaporodás	Lom-OMP (kétféle izoform)	Pete fejlődést serkenti	YYEAPPDGRHLLLQPAPAAVAPA(A/S)PASWPH-QQRRQALDEFAAAAAAADAQFQDEEDGGRRV
	Aea-OEH	Óvrium ekdizon termelését serkenti	QPTNVLEIRCKLYSGPAVQNTGECVHGAELNPCGKLSCLKGVG-DKCGESTAGIHMSGKSCASGLMCCGGQCVGCKNGICDHRLCPPRL
	Lyd-TE	Herék ekdizon termelést serkenti	ISDFDEYEPLNDADNNEVLDF
	Aea-TMOF	Tripszin aktivitást gátolja	YDPAPPPPPP
	Neb-kolloosztatin	Pete szikbeépülését gátolja	SIVPLGLPVPIGIVVGPR
	Hez-PBAN	Feromon szintézist serkenti	LSDDMPATPADQEMYRQDPEQIDSRTKYFSPRLamid
Metabolizmus és homeosztázis	Lom-AKH-I	Lipid mobilizációt serkenti	pQLNFTPNWGTamid
	Mas-AKH	Lipid mobilizációt serkenti	pQLTFTSSWGamid
	Pea-CAH-I	Szívfrekvencia fokozó	pQVNFSPNWamid
	Hez-HrTH	Trehalóz szintet fokozó	pQLTFSSGWGNamid
	Mas-DP-I	Folyadék kiválasztást serkenti	RMPSLSIDLPM SVLRQKLSLEKERKVHALRAAANRNFLNDIamid
	Patkány-CRF	ACTH termelést serkenti	EEPPISLDLTFHLLREVLEMARAEQLAQQAHSNRKLMEIamid
	Lom-AVP-DP	Folyadék kiválasztást serkenti	CLITNCPRGamid CLITNCPRGamid CYFQNCPRGamid
	Gerinces-AVP	Vér-agy gát permeabilitást serkenti	
Izommozgások	Lom-neuroparsin	Antidiuretikus hatású a végbélben	NPISRSCEGANCVVDLTRCEYGDVTDFFGRKVCAKGPBGDKC-GGPYELHGKCGVGMDCRCGLCSGCSLHNLQCFFFEGLPSSC
	(Pea)-Proktolin	Általános izomserkentő	RYLPT
	Mas-CAP	Szív működést serkenti	pQLYAFPAVamid
	Lom-TK-I	Viscerális izmokat serkenti	GPSGFYGVRAmid
	Emlős Substance P	Bél simaizom serkentő stb.	RPKPQQFFGLMamid
	Lem-MK-I	Viscerális izmokat serkenti	DPAFNWSWamid
	Lem-PK	Viscerális izmokat serkenti	pQTSFTPRLamid
	Lem-SK-I	Viscerális izmokat serkenti	EQFEDY(SO ₃ H)GHMRFAmid
	Gerinces-CCK	Bélmozgás és pankréáz enzim szekréció serkentő	DY(SO ₃ H)MGWMDFAmid
	Lom-MIP	Mioinhibitor hatású	AWQDLNAGWamid
	Lom-FaRP-I	Mioinhibitor hatású	GQERNFLRFAmid
	Neb-MS (FaRP)	Miosuppresszin hatású	TDVDHVFLRFAmid
	Puhatestű-FMRF	Motoros neuronok gátlása	FMRFamid

1. táblázat: A legfontosabb és legismertebb rovar-neuropeptidek a dolgozatban vázolt csoportosítás alapján. A dőlt betűkkel a felette található hormonnal rokonságot mutató ismert, egyéb állati eredetű neuropeptid kerül bemutatásra. A **vastagított karakterek** pedig az azonos aminosavakat, vagy rokon vegyületeket, ill. hasonló végződéseket emelik ki. Egybetűs kódok: A: Ala; C: Cys; D: Asp; E: Glu; F: Phe; G: Gly; H: His; I: Ile; K: Lys; L: Leu; M: Met; N: Asn; P: Pro; Q: Gln; R: Arg; S: Ser; T: Thr; V: Val; W: Trp; Y: Tyr.

II/4.(A) Növekedéssel és fejlődéssel kapcsolatos neuropeptidek, hatásmechanizmusuk

a). A prothoracikotropikus hormon (*Prothoracicotropic hormone; PTTH*) tekint vissza – közvetve és közvetlenül – a legnagyobb múltra és érdeklődésre, hiszen a XX. évszázad elején már gyanították hogy a vedlést és metamorfózist egy „agyi faktor” irányítja, de egészen az 1980-as évek közepéig kellett várni, amíg *B. mori* fejből sikerült izolálni a *Bom-PTTH*-t (Ishizaki és mtsai., 1983). A hormon egy nagy molekulású (30kD) és egy kisebb (4kD) *PTTH* egységből áll. Az utóbbi egység –nevezik *Bombyxin*nek is– öt további részből áll (*PTTH-I-V*). A 4kD *PTTH-II*-t tovább vizsgálva megállapították, hogy az, két, ún. A és B láncból áll (diszulfidhidak kötik össze), mely szembevető azonosságot mutat a gerinces inzulinnal, különösen az A lánc, ahol a 20 aminosavból 10 sorrendben is megegyezik. A tényleges szteroidogén peptid, –amely a *PTG* endokrin mirigyben a legfontosabb vedlést indukáló hormon, az *ekdizon* szintézisét serkenti– a 30kD molekulatömegű *PTTH* a selyemhernyóban. A *Bombyxin* –az inzulintól kissé eltérően– jelentős mértékben, inkább a fő tartalék szénhidrátokat mérsékli. A glikogén-foszforyláz (*Glikogene-phosphorylase; GlPh*) serkentésén keresztül a zsírtest glikogén tartalmát, valamint a vérnyirok trehalóz hidrolízisével, a trehalózt is csökkenti (a rovar vérnyirokban keringő legfontosabb diszaharid). Ismert már, a fentivel ellentétes hatású, prothoracikostatikusan hormon (*Prothoracicostatic peptide; PTSP*) is.



3.ábra: A *PTTH* hatásmechanizmusa a *Manduca* és *Bombyx* lepkefajok *PTG* sejtjeiben.

A vérnyirokban keringő *PTTH* *Gp* kapcsolt receptorhoz kötődve egyrészt megnyitja a Ca^{++} -csatornákat és a beáramló Ca^{++} , másrészt a kapcsolódó foszfolipáz-C-nek (*FLC*) köszönhetően az IP_3 közreműködésével további Ca^{++} szabadul fel az endoplazmatikus retikulum rezervoárból (szürke lemezes szerkezet). A kialakuló Ca^{++} -kalmodulin (*CaM*)-komplex, (valamint közvetlen receptor kölcsönhatás miatt is?) aktiválja az *AC*-t és a keletkezett *cAMP* indukálja a protein-kináz-A-t (*PKA*). Ezt követően szintetizálódik ill. aktiválódik a koleszterolból *ekdizon* szintetizáló enzimmé. A végtermék a vérnyirokba ürül. (Smith /1995/ után)

A *PTTH* hatásmechanizmusa *in vitro* kísérletek alapján jól ismert (3. ábra) (Smith, 1995). Egy klasszikusnak mondható *cAMP* közvetített jelátadási folyamat zajlik le, és a hatásmechanizmus tekintetében azt is tudni kell, hogy amennyiben a lárvális karakterekért felelős *JH* koncentrációja magas az adott szervezetben akkor egyrészt a *PTTHr* inkompetensnek találták, másrészt pedig maga az *ekdizon* szintézis folyamata is gátlást szenved (Gu és mtsai., 1997). A *PTTH* mennyiségét és kibocsátását egyik oldalon belső óramechanizmusok befolyásolják az *Ns*-ekben, a másikon, proteázok bontják a feleslegben keringő és receptorhoz nem kötött *PTTH*-t.

b). A rovar *CA*-ban eddigi ismereteink szerint egyetlen hormon típus, a *JH* szintetizálódik, amelynek több formája ismert. Ez a hormon nemcsak a vedlések során a lárvális állapot fenntartásáért felelős, hanem az imágók esetében a szikanyag szintézis és felhalmozás (*vitellogenesis*) hormonális irányításában játszik döntő szerepet. Ez a sokféle funkció mindenképpen feltételezi szintézisének, kibocsátásának stb. magasabb idegi és/vagy hormonális irányítottságát.

Az allatoregulációs peptidek (a *JH* szintézisét serkentik, vagy gátolják a *CA*-ban) közül ismerjük az *Allatotropinokat* (*AT*) és *AST*-ket. Az *AT*-k a *JH* szintézisét serkenteni a *CA*-ban. Eddig a 13 aminosavból álló *Mas-AT*-t (Kataoka és mtsai., 1989) és az ettől csak N-terminálisan kissé eltérő a sárgalázszúnyogból (*Aedes aegypti*) származó *Aae-AT*-t ismerjük (Veenstra és Costes, 1999) és más hormonnal (családdal) nem mutatnak lényegi szekvencia azonosságot. Szintetikus analógokkal végzett vizsgálatok azt mutatják, hogy az *in vitro* hatásért a C-terminális végnek van fontos szerepe. Számos fajból izoláltak azóta, a *Mas-AT*-vel azonos peptidet, több közülük *pleiotropikus* (pl. viscerális izomserkentő hatású).

A *JH* szintézis serkentése elsősorban a megnövekedett *CoA* észterek, acetil- és propionil-*CoA* (*JH* bioszintézishez nélkülözhetetlenek) igény biztosításán keresztül nyilvánul meg. A transzaminázok serkentése Ca^{++} beáramlás, valamint inozitol-trifoszfát (*IP₃*) jelátadási rendszeren keresztül történik.

Az *AST*-k olyan peptidek, melyek a *JH* szintézisét képesek gátolni *in vitro* (Stay és mtsai., 1994). Az *AST*-knek eddig három fő szerkezeti típusa ismert. Az első a „csótány” (*cockroach*) vagy A-típusú, amelynek *Y/FXFGL/Iamid* C-terminális vége van. Struktúráisan eltérő szerkezetű oligopeptidek, köztük legismertebb a 13 féle *Dip-AST* (*dipsztatinok*), melyek C-terminális végződése azonos. Más fajokból (pl. *D. melanogaster*, *A. aegypti*, *Calliphora vomitoria* /köpölgő/, *M. sexta*) is izoláltak vagy előre jeleztek A típusú *AST*-t, de *in vitro* *JH* bioszintézis gátlására viszont csak csótányokban és tücskökben voltak képesek. Az első *ASTr*-t is az ecetmuslicából izolálták (Birgül és mtsai., 1999) de ún. reverz fiziológiai módszerrel,

nevezetesen az emlős szomatosztatin/galanin/opioid receptor családdal rokonságot mutató új receptorhoz funkcionális ligandot kellett keresni, melynek köszönhetően szintén ecetmuslicából sikerült azonosítani egy, az A-típusú *AST*-khez hasonló molekulát, ami viszont elsősorban spontán viscerális izom aktivitást gátol. A második a „tücsök” (*cricket*), vagy B-típusú *AST*, ami hatásos *JH* szintézis inhibitor ebben a fajban, továbbá a vándorsáskában az utóbél és petevezető spontán izommozgását gátolja *in vitro*, ellenben nem *AST* hatású. További érdekesség, hogy a selyemlepkében a *PTG PTTH* szintézisét gátolja lárvakorban. A harmadik „lepke” (*moth*) vagy C típusú *AST*-t a *M. sexta*-ból izolálták és nemrég azonosítottak hozzá G-protein (*Gp*) kapcsolt receptort, az ecetmuslicából (Kreienkamp és mtsai., 2002). Molekuláris biológiai eszközökkel C típusú *AST*-t is izoláltak ecetmuslicából, de *in vitro JH* bioszintézis gátló hatását csak egyes lepkékben sikerült kimutatni.

A *JH*-észteráz (*Juvenile hormone esterase; JHE*) indukáló faktorok a hormon bomlását serkenti a vérnyirokban.

c). A vedlés részfolyamatait irányító hormonoknak a lárvális, báb és imágó vedlés során fontos szerepük van. A vedlést beindító hormon (*Ecdysis triggering hormone; ETH*), az *epitrachealis* mirigy ún. *Inka* sejtjeiből származik és közvetlenül az izmok motorikus programját serkenti (*pre-ekdiziális* viselkedés). Az *ETH*-k pedig a régi kutikula levetését segítik elő sajátos csavaró, tekergő mozgást előidézve. Az ismert *ETH*-k igen nagyméretű nem amidált molekulák, melyek az agyban történő szintézis után a *CC*-be kerülve meghatározott időszakaszban ürülnek a vedlés előtt. A két peptid pozitív visszacsatolás révén segíti a vedlést. Említendő még a *Pre-ETH* neuropeptid, ami a fenti folyamatokat megelőzően fejti ki hatását.

d). A melanizációt és vörös pigmentációt serkentő peptid (*Melanization and reddish colouration hormone; MRCH*) a vedlést követően a melanin képződését befolyásolja a kutikulában. Több *MRCH* formát izoláltak a *B. mori*-ből és érdekes módon a *Bom-MRCH-I* szekvenciája megegyezett a *Bom-PBAN-I*-el (Matsumoto és mtsai., 1990). Az N-terminális vég bizonyos hasonlóságot mutat az inzulin típusú növekedési faktor-II-vel, míg a C-terminális pentapeptid szekvencia ez esetben is a *Pirokinin (PK)* miotropikus alcsaláddal egyezik meg (ld. lentebb). Úgy tűnik, hogy a konzervatív C-terminális pentapeptid (*FXPRLamid*) sokféle funkcióért felelős fajtól, fejlődési szakasztól, szaporodási állapottól függően.

e). A vedlés után bekövetkezik a világos lágy pro-kutikula szklerotizációja (szilárdulás és sötétedés), amit a *burzikon (Bursicon)* polipeptid irányít (30~50kD). Az agyban termelődik, de a

tori és potroh ganglionokból szabadul fel és a keringés útján jut el az epidermiszig. A sebek regenerációjában is fontos szerepet tulajdonítanak a *burzikonnak*.

f). A nem megfelelő környezeti tényezőkre való reakció egyik legtipikusabb példája a diapauza, azaz a fejlődés vagy szaporodás felfüggesztése vagy szüneteltetése. Ez a régóta ismert jelenség szintén hormonális befolyásoltság alatt áll. A *B. mori* embrionális diapauzáját a petét rakó nőtény *SOG*-ban termelődő *DH* irányítja. Ez a hormon a C-terminális pentapeptid alapján szintén a *FXPRLamid*-ok tagja. Egyes fajok vándorló alakjainak kialakulása is összetett és hormonálisan irányított (befolyásolt) folyamat eredménye.

II/4.(B) Szaporodással kapcsolatos neuropeptidek, hatásmechanizmusuk

A gerincesek esetében a gonadotropinok struktúráisan és hatásaikban is viszonylag egységesek. Ezzel szemben a rovarok szaporodása számos egymásra épülő mozzanat sorozata, kezdve a nemek meghatározásától a peterakásig bezárólag, melyeket humorális tényezők, mint a *JH*-k, *ekdizon* és számos neurohormon irányít és akár fajspecifikus is lehet (De Loof és mtsai., 2001).

a). A petefészek (*ovarium*) fejlődést serkentő hormonok közül az ováriumérési peptid (*Ovarian maturing peptide/parsin; OMP*) míg a tojás növekedésére ható hormon a tojásfejlődést serkentő neuropeptid (*Egg development neurosecretory hormone; EDNH*) vagy ovárium ekdiszteroidogenikus hormon (*Ovarian ecdysteroidogenic hormone; OEH*) a legismertebb. Az *OMP* nagyméretű, 65 aminosavból álló peptid melyet a vándorsáskából (*Locusta migratoria*) izoláltak először (két izoformja van) és a peptiddel történő kezelést követően koraérett petéket eredményez. Hasonló hatású az *OEH*, ami az ovárium *ekdizon* (sok faj imágójában gonadotróp hatású hormon; ösztrogén ekvivalens) termelését serkenti a vérszívás után az *A. aegypti*-ben, ami pozitív visszacsatolás révén hozzájárul a petefejlődéshez.

b). Eddig egyetlen, a herék működésére ható tesztikuláris ekdizotropint (*Testis ecdysiotropin; TE*) izoláltak *L. dispar*-ból. A *Lyd-TE* a *PTG* *ekdizon* termelését nem serkentette, csupán a herékben zajló *ekdizon* bioszintézisét.

c). Több fajból izoláltak nemi működést gátló, antigonadotropikus hormont; (*Oostatic hormone; OSH*), mint például legyekből, szúnyogokból vagy vérszívó poloskákából. Eddig néhány, a tripszin mennyiségét befolyásoló faktor (*Trypsin modulating oostatic factor; TMOF*) vált ismertté (Bylemans és mtsai., 1994). A tripszin és kimotripszin enzimek aktivitását gátolja a bélfal epithélium sejtjeiben, mely közvetve kihat a vitellogenezisre, tehát a petefejlődésre.

A *TMOF* eddigi ismereteink szerint nem klasszikus értelemben vett neuropeptid, mivel vérszívást követően néhány órával a szúnyog petefészkek follikuláris hámsejtjeiben szintetizálódik, majd a vérnyirokban szállítódva a középbél epithélium sejtjeinek specifikus receptoraihoz kötődve gátolja a proteázok (főleg tripszin, esetleg kimotripszin) szintézisét/aktivitását. Ennek köszönhetően leáll a vér emésztődése, aminosavak felszabadulása, ami a szik szintetizálódására és felhalmozódására gátlólag hat (visszacsatolás következtében), tehát megáll ill. befejeződik a petefejlődés. *In vivo* kezeléseket követően, megállapították, hogy táplálék útján adult szúnyogokba juttatva a bél epithélium sejtjein keresztül a vérnyirokba kerül, képes kötődni a középbél hámsejtjeihez és leállítja a tripszin bioszintézist, miközben megtartja biológiai aktivitását. A vízbe juttatva a szúnyog lárvák is elpusztulnak a *TMOF*-től, ugyanis a táplálék megemésztéséhez szintén tripszin jellegű enzimre van szükségük. Ez esetben azonban viszonylag nagyobb mennyiségre/dózisra van szükség a letális hatás eléréséhez.

A kollosztatinok, (*Colloostatin*) a szikfehérje beépülését gátolják a petékbe, mint a húslégyből (*Neobellieria bullata*) izolált peptid esetében találták.

d). A szaporodás szempontjából –elsősorban a lepkék esetében– nagyon fontosak a feromonotropikus (*PT*) neuropeptidek, azon belül a *PBAN*-ek. Mind a *PBAN*-ek keletkezése, mind pedig a vérnyirokban történő keringése, végül pedig a nőstényekben található célszervben, a potroh 8-9 szegmensénél –epidermális, sok esetben kitüremkedésként a tojócső előtt– található feromonmirigyben (*Pheromone gland*; *PG*) kifejtett hatása (feromontermelés indukálásával) a rovar endokrinológia, élettan és biokémia egyik legérdekesebb és legkutatottabb területe. A rovar feromonok a kémiai kommunikáció egyik kulcselemét jelentik. A feromonok (el nem ágazó, 1-3 telítetlen kötést hordozó, hosszúszenláncú molekulák aldehid, alkohol vagy acetát funkciós csoporttal) elsősorban a lepkefajokban ismertek, szigorúan fajspecifikusak és a nőstények termelik a *PG*-ben a hímek csalogatására (Tamaki, 1985). A feromonok bioszintézisét, eddigi ismereteink szerint, elsősorban a *PBAN* serkenti és befolyásolja a célszervben. Az első *H. zea*-ból izolálták (Raina és mtsai., 1989). Az ismert *PBAN*-ek 33-34 aminosavból álló peptidek, az *SOG*-ban termelődnek és időszakosan ürülnek napszaktól függően a *CC*-ből, és/vagy a hasi ganglionokból. A *PT/PBAN* neuropeptideket bővebben az **1. rész IV. fejezetében** tárgyalom.

A feromonok (és összetételük) faji sajátosság, ami tág lehetőséget biztosít arra, hogy akár monitorozásra, előrejelzésre, vagy gyérítésre, ill. tényleges utódszám csökkenésre használjuk a megfelelő szintetikus feromonkészítményeket. Ebből az is következik, hogyha sikerül célzottan megakadályozni, vagy befolyásolni a nőstények szigorú endokrin irányítás (elsősorban *PBAN*, valamint *JH*-k, és *ekdizon*) alatt álló feromontermelését, az kedvező

eredményre vezethet. Az érdeklődés a *PBAN*-ek, valamint az *FXPRLamid* C-terminális vég megegyezése révén a vele rokonságot mutató *PK*-k (spontán izommozgást serkentők) felé fokozott, ugyanis a biológiai aktivitáshoz már a C-terminális pentapeptid is elégséges. A nőstényekbe injektált szintetikus *PBAN*-ek vagy *PK*-k hatékonyak maradnak és a feromon-termelés révén jól vizsgálhatók. Az előzőekből következik, hogy *PBAN/PK* analógok, mimetikumok, agonista/antagonista tervezése, előállítása komoly gyakorlati lehetőségekkel kecsegtet.

Choi és mtsai.-nak (2003) sikerült azonosítania majd teljes hosszában klónoznia a *H. zea* lepke *PG*-ből egy ún. *Gp* kapcsolt (*G Protein-Coupled receptor*; *GPCr*) *PBAN/PKr*-t (346 aminosavból áll). Hull és mtsai. (2004) a közelmúltban a *Hez-PBANr*-hez képest egy 67 aminosavval hosszabbat klónoztak a selyemlepke *PG*-ből. Mint kimutatták, ez a C-terminálisan „elhelyezkedő” hosszabb szakasz nélkülözhetetlen szerepet játszik a *PBAN*-hez történő kötődés (aktiválódás) során az internalizáció folyamatában. A *PBAN* részletes hatásmechanizmusáról és az új eredményekről a **2. részben** számolok be.

II/4.(C) Metabolizmust és homeosztázist befolyásoló neuropeptidek, hatásmechanizmusuk

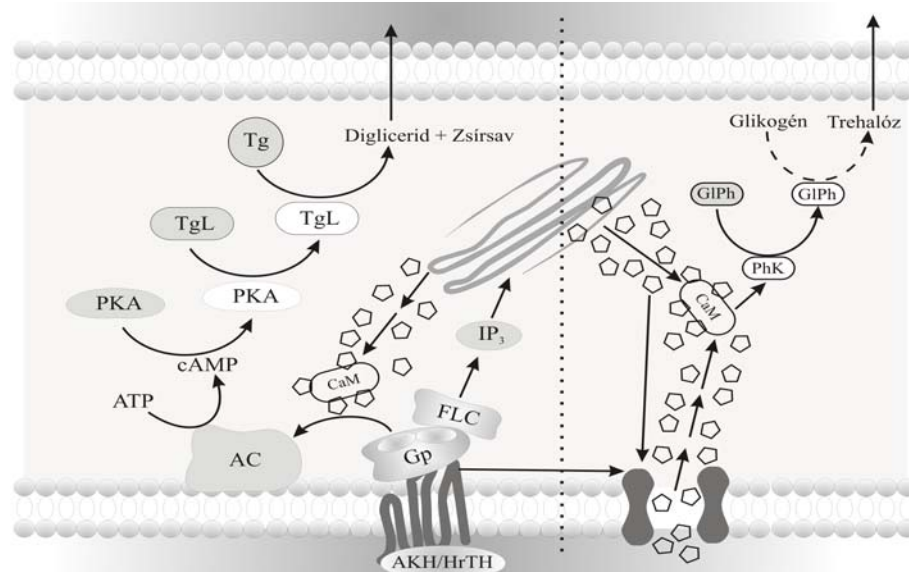
Rovarokban az intermediér anyagcsere fő színtere egy sajátos szerv, a zsírtest, ami lebe-nyekből, szalagokból áll és kitölti csaknem a teljes testüreget. Szerepe van tartaléktápanyagok felhalmozásában lipid/zsír, szénhidrát stb. anyagcserében, valamint a tojások fejlődése szempontjából nélkülözhetetlen fehérjékben gazdag szikanyagok és egyes fajokban ún. diapauza proteinek bioszintézisében, továbbá részben a méregtelenítésben, kiválasztásban is, végül pedig benne fejlődnek a többféle funkcióval rendelkező vérsejtek. Sok azonosított neuropeptid cél-szerve a zsírtest, mely hormonok az anyagcsere folyamatokat alapvetően befolyásolják, továbbá a belső egyensúly fenntartásában (víz-ion háztartás) közvetlen szerepet játszanak (Gäde, 2004).

a). Az *AKH*-k a lipidháztartásért felelősek és ez volt a legelső „valódi” rovar neuropeptid család (Stone és mtsai., 1976). Ez a hormon elsősorban a lipid felszabadulást serkenti a zsírtestből és a raktározott trigliceridet (*Tg*) digliceriddé (*Dg*) bontja, amely a vérnyirokba kerül és abban szállítódik. Jelentős energiaigényes folyamatok esetében, mint például a repülés (vándorlás, napszaki aktivitás), kulcsfontosságú. A hormonok legfeljeb 10-11 aminosavból állnak és sajátos módon a *CC*-ben keletkeznek. Több neuropeptid család tagjaihoz hasonlóan az amin véget általában piroglutamát blokkolja, míg a C-terminális vége amidált. Az *AKH* neuro-peptideket bővebben az **1. rész V. fejezetében** tárgyalom.

Az *AKHr* azonosítása (Staubli és mtsai., 2002) jelentős lökést adott ennek a kutatási területnek, mely azzal a ténnyel is összefüggésben van, hogy az *AKH*-k *pleiotropikusak* és a fő lipid

mobilizációs hatásuk mellett emelhetik a vérnyirok szénhidrát szintjét a zsírtest glikogén-foszforiláz (*Glycogene phosphorilase; Glph*) aktiválásával, csökkenti a zsírsav (*fatty acid; Fa*) szintézist az acetát felvétel gátlásán keresztül, csökkentheti az *RNS* szintézist, másrésről lehet miotropikus hatású is. Jelentős izommozgást serkentő hatása repülési sebesség, vagy intenzitás növekedésében nyilvánulhat meg repülő fajoknál, de nem repülőknél a mozgási aktivitás nő szintetikus peptid injektálást, vagy topikális kezelést (acetonitrilben /*AcNi*/, dimethylsulfoxilban /*DMSO*/, metanolban /*MeOH*/ stb. oldva) követően.

Az *AKH* egyszerűsített hatásmechanizmusa a 4. ábrán látható (Gäde és Auerswald, 2003). A repüléshez lipidet használó fajok esetében (sáskák, lepkék, bogarak) első lépcsőben, a vérnyirokban keringő *AKH* kötődik a zsírtest sejtthártyáján található *GPCr*-hoz, majd az adenilát-cikláz (*Adenylate-cyclase; AC*) aktiválódása révén megemelkedik a *cAMP*. A *cAMP*, valamint a felszabaduló belső Ca^{++} tartalékok és a kívülről beáramló Ca^{++} a protein-kinázon (*Protein kinase; PK-A*) keresztül aktiválja a *Tg*-lipázt (*TgL*). A sáskák esetén a keletkezett *Dg*-k a sejtéből kijutva, a vérnyirokban *lipoproteinek*hez ún. *lipoforinok*hoz (*lipophorin; Lf*) kötődve jut el az izomsejtekig (Shapiro és mtsai., 1988; Ryan és van der Horst, 2000), ahol β -oxidációt követően energia szabadul fel (4. ábra bal oldala). A gerincesekkel ellentétben a *Dg*-ket,



4. ábra: Az *AKH* (hiperlipémikus) hatásmechanizmusa *Locusta* (bal oldal), ill. az *AKH/HrTH* (hipertrehalozémikus) hatásmechanizmusa *Periplaneta* (jobb oldal) fajok zsírtest sejtjeiben. Bal oldal: A kötődő *AKH* a *Gp*-kapcsolt receptoron keresztül és a felszabaduló Ca^{++} -al együtt aktiválja a membrán kötött *AC*-t. A *cAMP* aktiválja *PKA*-t, mely viszont a *Dg*-k (és *Fa*-k) keletkezését serkenti a *TgL* által. A *Dg*-k a vérnyirokba jutnak és *Lf*-k szállítják a célszervig. Jobb oldal: Az *AKH/HrTH* hormon a *Gp*-hez kötődik, mely közvetlenül nyitja meg a Ca^{++} csatornákat, valamint a kapcsolódó *FLC* közreműködésével IP_3 keletkezik, mely további Ca^{++} -ot szabadít fel a rezervoárból (szürke lemezes szerkezet). A kiszabaduló Ca^{++} szintén nyitja a Ca^{++} csatornákat. Végül a *CaM*-komplexek *PhK*-kat és ezen keresztül *GlPh*-kat stimulálnak és több köztiterméken keresztül glikogénből trehalóz keletkezik, ami a vérnyirokba jut. (Gäde és Auerswald /2003/ után)

valamint hidrokarbonokat, foszfolipideket szállító rovar *Lf*-ek a szállítási funkciót követően nem degradálódnak, hanem reverzibilisen leadják, majd felveszik „szállítmányukat”. Egy gyümölcsbogár (*Pachnodea sinuata*) zsírtestjében, a lehasított szabad *Fa* β -oxidációját követően keletkező acetyl-CoA a beáramló alaninnal prolinná szintetizálódik, mely utóbbi kijutva a vérnyirokba, a célsejtekben energiaforrásként szolgál. Ebbe a szerkezeti csoportba tartoznak még egyes, a szív működését/frekvenciát fokozó peptidek (*Cardioactivating hormone; CAH*), bár hatástanilag a mioaktivitást befolyásolók körébe (Ild. II/4. D).

b). A vérnyirok szénhidrát (trehalóz) szintjének alakulásáért a hipertrahalozémikus (*Hypertrehalosemic hormone; HrTH*) és hipotrehalozémikus hormonok (*Hypotrehalosemic hormone; HoTH*) a felelősek és szerkezetük alapján a fenti peptidekkel rokonok. A repüléshez szénhidrátot használó fajoknál, mint pl. a csótányoknál, szintén lezajlik az *AKH* vagy *HrTH* hatására a *cAMP* szintjének megemelkedése. Ezt követően a membrán kötött *FLC* az *IP₃* keresztül serkenti a belső Ca^{++} tartalékok felszabadulását miközben a *GPCr*-hez történő kötődés után a külső Ca^{++} is beáramlik és a foszforiláz-kinázon (*Phosphorilase-kinase; PhK*) keresztül, aktiválódik a *GLPh* és több közti termékén keresztül végül trehalóz keletkezik, ami a vérnyirokba jut (4. ábra jobb oldala) (Gäde és Auerswald, 2003).

A korábbi hipoglikémikus hormont/faktort (*Hypoglycemic hormone; HGH*) –melyet újabban ténylegesen már a *HrTH*-kkal azonosítanak– viszont részleges szekvencia hasonlóságot mutat az emlős glukagonnal, és a zsírtest glikogén szintjét csökkenti, úgy hogy közben a trehalóz szint pedig emelkedik.

c). A protein szintézist serkentő faktorok, valamint a fehérjék degradációját stimuláló faktorok szintén léteznek, amelyeknek pl. a ciklikusan szaporodó fajok esetében a *JH*-k és/vagy *ekdizon* mellett alapvető szerepük lehet a peteérésben. A *Lom-AKH*-kről másodlagosan kimutatták protein szintézist gátló képességüket is.

d). A rovarokban a kiválasztó rendszer a *Malpighi*-edényekből és az (utó)bélből áll. A diuretikus (*Diuretic peptide; DP*) és az antidiuretikus hormonok (*Neuroparsin*) a vízháztartásért felelősek, valamint a salakanyag eltávolozásáért és az ion egyensúlyért (Coast, 1998). Ide tartozik még az ún. víz és ion visszaszívásért felelős neuropeptid is (*Ion transport peptide; ITP*). Az eddig izolált és azonosított rovar *DP*-k általában 30%-nyi hasonlóságot mutatnak a gerinces Kortikotropin-kibocsátási faktorról (*Corticotropin-releasing factor; CRF*) ezért gyakran *CRF* típusú *DP*-nek is nevezik ezeket a viszonylag nagyméretű peptideket. Jelentősen kisebb a gerinces Arginin-vasopresszin (*AVP*) családdal nagyfokú egyezést mutató *Lom-AVP DP*. Ezek a

felfedezések is jól mutatják, hogy sok –a belső egyensúlyért felelős neuropeptid molekula– már a törzsfejlődés korai szakaszában kialakult és fennmaradt. A fentiekén túlmenően a különböző K-k (ld. lentebb) is rendelkeznek diuretikus aktivitással.

CRF-DP a *cAMP* jelátadási rendszeren keresztül fokozza a húgyanyag elválasztást, míg a K-k –más receptorhoz kötődve– a Ca^{++} beáramlás serkentése révén fokozzák az elválasztást. Az utóbbi szinergista hatása oly módon is kifejeződhet, hogy az izomsejtek serkentése révén az edények tubulusainak tekergő–csavaró mozgását is fokozza.

II/4.(D) Izommozgásokat befolyásoló neuropeptidek, hatásmechanizmusuk

A nem váz, hanem zsigeri izmok (pl. viscerális bél izomzat, petevezető izomzata, szív-izomzat, vagy *Malpighi*-edények körkörös és hosszanti izomzata stb.) jelentős részben saját miogén aktivitással rendelkeznek. Mozgásukat továbbá irányíthatják az idegrendszerből ill. egyes idegdúcokból kifutó idegek, továbbá számos ún. miotropikus (serkentő) és mioinhibitor (gátló) neuropeptid. Ezek a mioaktív peptidek a központi idegrendszerben, vagy környéki dúcokban szintetizálódnak és vagy a vérnyirok közvetítésével vagy akár közvetlenül az idegrostokon vándorolva jutnak el a célszervig (Schoofs és mtsai., 1994). A csoportot részletesen a **VI/1. Előzmények** fejezetben mutatom be.

A miotropikus (*MT*) család a legkevésbé egységes, ami a szerkezetet illeti, ellenben a legismertebbek és a legtöbbet kutattak. Legfontosabb feladatuk a különböző zsigeri és/vagy mozgásért felelős izmokra gyakorolt (valamilyen serkentő) hatásuk. Ezeken túlmenően számos további élettani aktivitással rendelkeznek, de az első leírt hatásuk alapján sorolják ide.

Legismertebb tagja a *proktolin*, az első meghatározott rovar-neuropeptid, amit a *P. americana* egész testkivonatból izoláltak (Starratt és Brown, 1975). A *MT*-k többi tagját csak jó tíz évvel az első hormon azonosítása után kezdték felfedezni. A legtöbb ilyen peptidet a madeira csótányból (*L. maderae*) azonosították, mint pl. a *leukokinineket*, *leukopirokinineket*, *leukoszulfakinineket*; vagy később a vándorsáskából (*L. migratoria*) (*lokusztamiotropinok*, *lokusztakininek*, *lokusztapirokinin*, *lokusztatachikininek*, *lokusztaszulfakininek*, stb.) (Schoofs és mtsai., 1994).

A mioinhibitor család neuropeptidjei (*MIP*), amint azt nevük is sugallja elsősorban valamilyen zsigeri izommozgást gátló hatással rendelkeznek. A *MIP* családon belül van egy jelentős ún. *FMRF*-típusú (végződésű) peptid alcsoport (Phe-Met-Arg-Phe) (*FMRF Related Peptides*; *FaRP*) és más néven olykor *mioszupresszineknek* (*MS*) is nevezik (Orchard és mtsai., 2001).

III. CÉLKITŰZÉSEK

Az értekezés –a rovar-endokrinológián belül– a neuropeptidek kutatásában és hatásmechanizmus vizsgálatok világából két fő területet ölel fel:

1. rész (IV, V, VI fejezetek): Több csoportba tartozó, különféle neuropeptidek tisztítása, izolálása és meghatározása káposzta bagolylepkéből (*M. brassicae*), valamint kapcsolódó hatásvizsgálatok, legfontosabb biológiai jellemzőinek leírása, klasszikus eszközök felhasználásával. (i.e: „Többfélét” egyből megközelítés). Általánosságban, egyébként létezik „aktivitás-irányultság” (van elképzelésünk előzetesen a peptid funkciójáról), vagy „szerkezet-irányultság” (adott szerkezetű peptid léte valószínűsíthető) peptid kutatás (Fónagy, 1994).

A feladat megvalósítása magába foglal egyes bioteszt módszerek kidolgozását vagy továbbfejlesztését, olyan szempontból is, hogy később más fajra ill. hatások vizsgálatára is lehetőleg alkalmasak legyenek. Lipid és trehalóz, valamint mioaktivitás tesztek használata heterológ (más faj) ill. homológ (azonos faj) rendszerekben.

2. rész (VII, VIII fejezetek): A *PT* pontosabban a *PBAN* neuropeptidek hatásmechanizmusának részletes feltárása a *PG*-ben, a feromonszintézis folyamatának és sejttani eseményeinek összehasonlítása selyemlepkében (*B. mori*) és káposzta bagolylepkében (*M. brassicae*) a legkorszerűbb eszközök igénybevételével, a vizsgálati módszerek széles spektrumának alkalmazásával. (i.e: „Egyfélét” többől megközelítés).

Cél volt, hogy a korábbi eredményeket kiindulásként felhasználva részletesen feltárjuk a *PBAN* hatásmechanizmusát, jelátadási rendszerét elsősorban a selyemlepkében, valamint a káposzta bagolylepkében és ezért az alábbi megközelítéseket választottuk:

- A folyamatban résztvevő enzimeket hagyományos izolációs módszerekkel ill. közvetett vizsgálati eszközökkel meghatározni és jellemezni;
- Farmakológiai ágensek felhasználásával feltárni a jelátadás lépéseit;
- Fény-, fluoreszcens- és elektronmikroszkópia lehetőségeinek felhasználásával (klf. vizualizációs technikák) morfológiai megfigyelésekkel is „végigkövetni” a feromon-bioszintézisét;
- A prekursorok és közti termékek vizsgálata és azok kompartmentalizációja;
- A *PBAN* sejszintű hatásmechanizmusának, a feromon-bioszintézis egyes lépéseinek figyelembevételével a folyamat modellszerű kidolgozása a fenti vizsgálatok, valamint egyéb vizsgálati eredményeinek segítségével.

**1. rész: KÜLÖNFÉLE NEUROPEPTIDEK TISZTÍTÁSA, IZOLÁLÁSA,
MEGHATÁROZÁSA MAMESTRA BRASSICAE-BÓL, VALAMINT
KAPCSOLÓDÓ HATÁSVIZSGÁLATOK**

IV. FEROMONOTROPIKUS NEUROPEPTIDEK

IV/1. Előzmények

A rovarok szexuális kommunikációjában, ill. a sikeres párzás létrejöttében a fajspecifikus szexferomonoknak jelentős szerepük van és a lepkék rendjén belül igen elterjedtek (Tamaki, 1985). Az 1990-es évek elején is már több száz lepkefaj feromonja ismert volt (Arn és mtsai., 1992), köztük a mezőgazdaságilag is jelentős kártevőé, a *M. brassicae*-é is (Z11-16OAc: 16OAc: Z9-16OAc; 90:10:1; Attygalle és mtsai, 1987).

Tekintettel arra, hogy a rovarok közötti szexuális kommunikáció növényvédelmi célokból történő megzavarására csak szintetikus feromonkészítmények álltak akkor (és még napjainkban is főleg) rendelkezésre (klf. szexferomon csapdák) kézenfekvőnek tűnt és feladatul tűztük ki olyan kutatások folytatását, ami –lehetőleg, magának a feromontermelésének megzavarása révén– újabb, környezetbarát, specifikus növényvédelmi perspektívákat nyit. A távlati célt elsődlegesen a feromontermelés biológiájának mélyreható és átfogó vizsgálatával kívántuk elérni kapcsolódva néhány világviszonylatban is vezető laboratórium kutatási irányzatához. Ehhez az első lépcsőt az jelentette, hogy *PT* neuropeptid(ek) izolációját, meghatározását végezzük el *M. brassicae*-ból. A feromontermelés hormonális irányítottságáról és a folyamat részleteire vonatkozó kutatások eredményeiről –ugyanebben a fajban– a **2. rész VIII.** fejezetében írok.

Az első *PT* peptid elsődleges szerkezetét 20 ezer *H. zea* felhasználásával határozták meg (Jaffe és mtsai., 1986a; Raina és mtsai., 1987, 1989, ez utóbbi a tényleges végeredmény közlése). A peptidet Raina és Gäde (1988) nyomán *Hez-PBAN*-nek nevezzük. A *B. mori*-ból Kitamura és mtsai. izolálták a szintén 33 aminosavból álló *Bom-PBAN-I*-et (1989), ill. a 34 aminosavból álló *Bom-PBAN-II*-t (1990) (ez utóbbi egy R-aminosavval hosszabb az N-terminális végen). A *Bom-PBAN-I* lárvakorban a vedlés utáni melanizáció és vörös pigmentáció folyamatát serkentő hormonnként működik (pigmentációs biotesztben; Matsumoto és mtsai., 1990), így ezt a hormont *Bom-MRCH*-nek is nevezhetjük. Később Masler és mtsai. (1994) izolálták és azonosították a 33 tagú *Lyd-PBAN*-t. A *PBAN* peptidek C-terminális végei szek-

vencia homológiát mutatnak az inzulin jellegű növekedési faktor II-vel (Kitamura és mtsai., 1989). Ezen felül *L. maderae*-ből, valamint *L. migratoria*-ból izolált *MT* hatású *PK* típusú peptidek C-terminális végeivel is azonosak (egy aminosav kivételével) (Holman és mtsai., 1990) és hasonlatosság található a *B. mori*-ből izolált *DH* is (Imai és mtsai., 1991). Saját vizsgálatok is bőségesen alátámasztják a *PBAN/PK* neuropeptidok *pleiotropikus* hatásait (Fónagy és mtsai., 1992c, Matsumoto és mtsai., 1992b). Áttörést jelentett a *PBAN* neuropeptid struktúrárt, bioszintézist stb. illetően, hogy sikerült a *Hez-PBAN* molekuláris klónozása (Davis és mtsai., 1992) is. A szekvenciát megszakítja egy intron a 14. aminosavnál. Érdekes módon a tényleges *Hez-PBAN* előtt található egy 8 aminosavból álló, míg utána pedig egy 10 aminosavból álló peptid szekvencia. Mindhárom peptid C-terminális pentapeptid vége azonos. A rövidebb peptidek akár független (pl. *MT* hatású, azaz, ez esetben peterakási) folyamatokat is befolyásolhatnak (Davis és mtsai., 1992). Matsumoto és mtsai. (1992b) pedig először azonosítottak egy 18 aminosavból álló *PT*-t a rizsrágó bagolylepke (*Pseudaletia separata*) lárvákból (*Pss-PT*).

A lepkék imágóiban az agy és az *SOG* a metamorfózis során egybeolvad és egységes struktúrát alkot. Ezért korábban „agyi faktornak” nevezték a feromontermelést serkentő anyagot (Raina és Klun, 1984), de ma már tudjuk, hogy a termelés ténylegesen az *SOG*-ban történik. Az első megbízható eredményeket immuncitokémiai eszközökkel érték el. A *Hez-PBAN* ellen termeltetett szérum segítségével *H. zea* nőstényekben az *SOG* hasoldali középvonalán találtak aktívan jelölődő sejtszöveteket. Hasonló eredmények mutatkoztak *M. brassicae*-ben (Tips és mtsai., 1992) olyan antiszérummal melyet egy *Locusta-MT* peptid (*Lom-MT-I*, Schoofs és mtsai., 1990c) ellen termeltettek (anti-*Lom-MT-I* szérum, de ez esetben a peptidek C-terminális végei közötti hasonlóság –*FXPRLamid*– ténye mindenképpen fontos (*pleiotropikus* hatás). Ez megerősíti azt a közlést is mely szerint a *M. brassicae*-ben a feromontermelést minden bizonnyal egy „agyi faktor” irányítja (Bestmann és mtsai. 1989; Jacquin-Joly és mtsai. 1994). Ez utóbbi eredmények a *M. brassicae PT* neuropeptid tervezett izolációjához fontos előzménynek voltak tekinthetők.

A hormon mennyiségére korábban csak a kivont anyag fej-ekvivalens arányaiban tudtak következtetni, és ezek alapján úgy találták, hogy 1/8 fej-ekvivalens mennyiség már képes feromontermelést indukálni (Raina és mtsai., 1987). Szintetikus *Hez-PBAN*, ill. *Bom-PBAN* segítségével ezek az eredmények *H. zea*-ban 0,5-1 pmol-nak (Raina és mtsai., 1991), míg *B. mori*-ban 0,13-0,5 pmol-nak (Kitamura és mtsai., 1989) adódtak *in vivo* körülmények között. További pontosítást immuncitokémiai és Enzim kapcsolt immunabszorpciós próba (*Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay; ELISA*); módszerek kombinációja tett lehetővé, így a hímekben 5 pmol-nak, nőstényekben 4,5 pmol-nak adódott a hormon a vándor bagolylepke, *H.*

peltigera-ban (Gazit és mtsai., 1992). További vizsgálatok során *H. zea*-ban 0,1-0,2 pmol mennyiséget mutattak ki a *CC-CA* komplexben (Kingan és mtsai., 1992). Jelentős mennyiséget találtak a hasdúc-láncban a fotóperiódus ideje alatt (azaz egyfajta tárolásról van szó?) az egyébként sötétben aktív *H. zea*-ban (Teal és mtsai., 1989), míg a tor-, potroh-, terminális potroh-ganglionban nem volt kimutatható mennyiség. Egy másik vizsgálat sor a gyapottok bagolylepkében (*H. armigera*) pedig azt tárta fel, hogy a sötét fázisban jelentősen több *PBAN* található a *CC*-ben és a tor-ganglionban, míg a fotóperiódus alatt a terminális potroh-ganglionban van nagyobb mennyiség (Rafaeli és mtsai., 1991).

A fenti, némileg ellentmondásos eredmények alapján feltételezhető, hogy többféle irányítási típussal állunk szemben. A *PBAN* *SOG*-ban történő termelődését, *CC*-ban való tárolódását majd a vérnyirokba történő periodikus kiürülését feltételezték eredetileg, mégpedig a *PBAN* a *CC*-ben való előfordulása, majd *in vivo* tesztekkel bebizonyított fluktuációja a fény- és sötétszakaszban (Raina és mtsai., 1991), ill. más rovar-neuropeptidek analógiájára a termelődés, kiürülés, keringés alapján. A feltételezések ellenére a vérnyirok nem mutatott *PT* hatást a *H. zea*-ban (Raina és mtsai., 1991) de ezek az „eredmények” metodikai elégtelenségből is adódhatnak. Jurenka és mtsai. (1991a) viszont kimutatták a vérnyirok *PT* aktivitást egy sodrómoly faj, *Argyrotaenia velutinana* nőstényeiben. Ez utóbbi fajban az irányítás mechanizmusa azonban az átlagosnál is bonyolultabbnak tűnik, mert itt a hormon először a *bursa copulatrix*-ra hat, mely egy ún. „burza faktor”-t termel, és ez a feltételezett anyag hat a *PG*-re (Fabrias és mtsai., 1992). A horda bagolylepkében (*P. unipuncta*) viszont a *JH* köztes (mediáló) szerepét hangsúlyozták a *PBAN* kiürülésben (Cusson és McNeil, 1989). A V-betűs aranybagoly (*Trichoplusia ni*) esetében pedig azt állították, hogy nem áll agyi/neurohormonális kontroll alatt a feromontermelés (Tang és mtsai., 1989). A *H. zea*-ban és egy másik vándor bagolylepkéfajban (*H. virescens*) alternatív utat javasoltak a hormonkiürülésre, nevezetesen, hogy a hormon a hasdúc-láncon szállítódik az utolsó potroh ganglionig, mely idegi impulzusok segítségével stimulálja a mirigyet (Teal és mtsai., 1989). Ezt a hipotézist az is erősíti, hogy a mirigyet behálózó axonális nyúlványokat és azokban neuroszekrécións jellegű granulumokat is találtak (Christensen és mtsai., 1991). A pontos hatáshely kérdése a *H. zea* esetében –a fentiekben leírtak ellenére– változatlanul eldöntésre vár, hiszen egyes eredmények szerint a mirigy serkenthető *Hez-PBAN* által oly módon, ha átvágják a hasdúc-láncot, vagy eltávolítják az utolsó terminális gangliont (Raina és mtsai., 1991). Christensen és mtsai. (1991) az ellentmondások tisztázására felvetették, hogy kétirányú kontroll alatt áll a *PG*. Azon túl, hogy axonális nyúlványok hálózák be az utolsó potroh ganglion felől, a mirigy rendelkezik *PBAN* receptorokkal is.

Két fajon, a *H. armigera*-ban és *H. zea*-ban peptideloszlási vizsgálatokat is végeztek napszaktól függően (Rafaeli és mtsai., 1993). Ezek az eredmények korábbi feltevéseket erősítettek meg, nevezetesen, hogy a *PBAN* folyamatosan szintetizálódik az agy-SOG komplex részben, és a fényperiódus alatt ott akkumulálódik. A sötét időszak közeledtével a *CC*-be szállítódik, és ezért csökken a szintézis helyén a hormon mennyisége. A sötétben folytatódik a hormon szintézise, ellenben folyamatosan ürül a *CC* felé. Minekután az agy-SOG régióban mindig (kortól, napszaktól függetlenül) tekintélyes mennyiségű hormon található és a *PG* is folyamatosan stimulálható, így feltehető, hogy a kontroll mechanizmus kulcsmozzanata a periodikus hormonkibocsátás (akár hasdúcláncba, akár közvetlenül a vérnyirokba). Ezen utóbbi mechanizmusok pedig környezeti hatásokra (pl. fény/sötét) lépnek működésbe. A szabályozás további bonyolultságára hívják fel a figyelmet azok a *H. zea*-ból származó eredmények, melyek egy endogén feromon-szuppressziós faktor (kb. 6 kD peptid) jelenlétét igazolták (Teal és mtsai., 1990). Ez a faktor a *PBAN* kibocsátást vagy hatását befolyásolhatja.

Korábban említésre került, hogy a *H. peltigera* hímekben is jelentős mennyiségű *PBAN* volt (Gazit és mtsai., 1992) de nem tisztázott a funkciója. Lehet, hogy „hím szexferomon” termelést serkent, mert egy vizsgálat szerint pl. a *H. virescens* hímek termelnek ilyen anyagot (Teal és Tumlinson, 1989). Ez utóbbi példa is érzékelteti, hogy egyetlen hormon is többféle funkciót láthat el fejlődési állapottól, nemtől stb. függően (Matsumoto és mtsai., 1990).

A kutatások folyamán számos *in vitro* biotesztet is végeztek, melyek a *PG*-t, pontosabban a feromontermelést a testtől izolálva, médiumban vizsgálták hormon (vagy egyéb anyag/ok/, farmakokemikáliák) jelenlétében. Ilyen vizsgálatok segítségével bizonyították, hogy a *PBAN* elsősorban közvetlenül mirigyre hat pl. a *H. armigera*-ban (Rafaeli és mtsai., 1990), a *H. peltigera*-ban (Altstein és mtsai., 1993), ill. *B. mori*-ban és a trópusi lápibagolyban (*Spodoptera litura*) (Fónagy és mtsai., 1992b) stb.



Fotó: Nagy Z. László

Káposzta bagolylepke (*Mamestra brassicae*) nőstény a tápnövényen

IV/2. Anyag és módszer**IV/2/1. Felhasznált rovarok/törzsek**

M. brassicae: A rovarokat (saját gyűjtés) az MTA NKI Júlia majori telephelyén külön tenyésztő szobában neveltük ($23\pm 1^{\circ}\text{C}$ ~ 55% *Rh.*, 18:6 *L:D*) félszintetikus tápon (Nagy, 1970). A bábokat szexálást követően külön választva keltettük, majd 10%-os mézes vízzel itattuk az imágókat. A *PT* bioteszthez a vizsgálatot megelőzően 24 órával dekapitáltuk a nőtényeket ezzel biztosítva *PT* neuropeptid „mentességet” és ezen keresztül a feromontermelés felfüggesztését. Sok esetben a levágott fejeket használtuk fel az agy-*SOG* szövet mintagyűjtéshez (ld. IV/2/3.).

H. virescens: A rovarokat a Center for Medical, Agricultural and Veterinary Entomology, USDA-ARS, Gainesville (Florida, U.S.A.) állatházában tenyésztették ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$, ~65% *Rh.* 12:12 *L:D*). A bábok szexálását követően a hímeket eltávolították, majd a kibújást követően a nőtényeket 5%-os cukros vízzel itatták.

IV/2/2. Alkalmazott *in vivo* biotesztek a *PT* aktivitás vizsgálatára

Az alkalmazott biotesztek a szekvenciálisan és szisztematikusan tisztított biológiai minták *PT* aktivitásának nyomonkövetését szolgálták először *M. brassicae*, majd *H. virescens* nőtényekben vizsgálva. A beszárított vizsgálandó tisztított mintát 10 μl vízben feloldva injektáltuk az előkészített tesztállat potrohába, majd megfelelő idő elteltével (*M. brassicae*, 1,5 óra; *H. virescens*, 1 óra) levágtuk a *PG*-t (tojócsővel) és *n*-hexánban kivontuk a feromont, majd mennyiségileg meghatároztuk. Ezen keresztül a kezelés ill. a kivont anyag biológiai aktivitása értékelhető. Minden esetben vizet (negatív kontroll) ill. szintetikus *Hez-PBAN*-t (pozitív kontroll; 5 ng/állat) is injektáltunk.

A feromontermelés serkentését vagy annak elmaradását –azaz kivonatok biológiai aktivitását– a *M. brassicae* esetében először egy gyors eljárással is sikerült tesztelni. A vékonyréteg kromatográfiás (*Thin Layer Chromatography*; *TLC*) módszerrel már három nőtény összevont *PG* extraktumából (50 μl *n*-hexánban) jól értékelhetően kimutatható a feromontermelés. A *TLC* lapokat az alapvonalra történő felcseppentést követően diklórmétán:toluol (5:2) elegyben futtattuk, kénsavban oldott vanillinnal lefűjtük, majd és 100°C -on hevítettük, vagy telített jódgőzben láthatóvá tettük. Ezt követően az előhívott *TLC* lapokat beolvastuk (*scanner*-rel) és így tárolhatókká is váltak az eredmények (5. ábra). A feromon-főkomponens (*Z11-16OAc*) standard segítségével értékelhető és „mérhető” volt a feromontermelés változása. Megállapítottuk, hogy ez a módszer nagyon alkalmas a sorozatvizsgálatra, mielőtt a munkaigényes és nem utolsósorban igen drága gázkromatográfiás (*GC*)

meghatározás módszerét használnánk az előtisztított minták/frakciók biológiai aktivitásának nyomonkövetésére. A módszer validálására ill. a tisztítás későbbi fázisában hagyományos GC mérést is végeztünk *Hewlett-Packard 5890* műszeren (MTA NKI Júlia major) korábbi leírás alapján (Jacquin-Joly és mtsai., 1994).

A *H. virscens* nőtényeket egy együttműködés keretében (MAKA, JFNo: 93/356) használtuk a tisztított minták biológiai hatékonyságának vizsgálatára ugyanis az U.S.A területére élő *M. brassicae* nem vihető be. A *PT/PK*-k közismert kereszt-reaktivására alapozottan (Fónagy és mtsai., 1992c) azonban a *H. virscens* is megfelelőnek bizonyult, mert a Magyarországon biológiai aktivitást mutató valamennyi minta aktívnak mutatkozott a másik tesztállatban is. A szűz nőtényeket 2-3 napos korukban meghosszabbított fotófázisban használtuk a tesztekhez, ugyanis ekkor szervezetükből (vércsatornák) kiürülnek a *PT* neuro-peptidek, ezért nem termelnek feromont sem (főkomponens: Z11-16:Ald). Az *in vivo* kezelést követően a *PG*-t levágtuk, külön-külön *n*-hexánban kivontuk a feromont, majd *GC* automatikus sorozat mérésre előkészítettük. A méréshez szintén *Hewlett-Packard 5890 GC*-t használtunk és korábban leírtaknak megfelelően mértük és értékeltük az eredményeket (Teal és mtsai., 1993).

IV/2/3. Agy-SOG komplex boncolása, szövet kivonás (*extrakció*) és előtisztítások

Összesen mintegy 3200 imágó (1-3 napos) nőtény agy-SOG komplexet boncoltunk ki és százazs egységekben polipropilén centrifuga csőbe (jégen) 1M-os ecetsavba (5ml) gyűjtöttük. Az idegszöveteket tartalmazó egységeket homogenizáltuk, majd szonikáltuk. Ezt követően háromszori centrifugálás (5000 rpm) következett, az üledéket pedig még kétszer 2ml ill. 1,5 ml 1M-os ecetsavval átmostuk, a felülúszókat egybegyűjtve.

Az összeggyűjtött felülúszót szilárd fázisú kivonásnak (*Solid phase extraction; SPE*) vetettük alá. Ehhez *Baker WP Carboxyl Acid* kation cserélő töltetet használtunk, melyet először 3-4 ml *AcNi* majd 6 ml 10%-nyi *AcNi*-t tartalmazó 1M-os ecetsavval kondicionáltunk. Ezt követően felöntöttük a felülúszót a kis oszlopra. Az átfolyó anyag összeggyűjtése után (1. csoport) aktív lemosással (50ml 10%-nyi *AcNi*-t tartalmazó 1M-os ecetsav) újabb frakciót szedünk (2. csoport), végül pedig ugyanazon folyadék fázissal (*eluens*) –ami emelkedő mennyiségű NaCl-ot (0,25-1M) tartalmazott– szintén mostuk (több alcsoportot tartalmazó 3. csoport). Valamennyi frakciót 0,1%-os trifluorecetsavval (*TFA*) hígítottuk, majd kondicionált *C₁₈*-as *Sep-Pak* töltetre vittük fel. A lemosást 0,1% *TFA*-ás vízzel kezdtük, majd felváltottuk 0,1%-os *TFA*-s 50%-os *AcNi*-rel. A frakciók felfogását követve a mintákat liofilizálással szárítottuk, majd *in vivo M. brassicae* biotesztnak vetettük alá (IV/2/2. pont).

Az elsődleges tisztítást követően elvégzett *PT* aktivitás biotesztek eredményeit követően, a továbbiakban csak az 1-es és 2-es csoport továbbtisztítása mellett döntöttünk. A következő lépcsőben szolid reverz fázisú *Baker WP Butyl C₄* töltetet használtunk, melyet először 0,1%-os *TFA*-s *AcNi*-el, majd 0,1%-os *TFA*-s vízzel kondicionáltunk. A tisztítandó frakciókat azonos térfogatú 0,1%-os *TFA*-val hígítottuk, majd felvittük az előkészített oszlopra. Az oszlopot emelkedő 0,1% *TFA*-s (5-10-20-40-60-100)%-os *AcNi*-el lemostuk, valamennyi frakciót külön gyűjtve (melyek elnevezése 1.05; 1.10; ill. 2.05; 2.10 stb.). A frakciókat beszárítottuk, majd újabb *in vivo M. brassicae* biotesztnak vetettük alá (IV/2/2. pont).

IV/2/4. HPLC elválasztás és tisztítás

A homológ biotesztek alapján mindössze 4 frakció került kiválasztásra melyet *HPLC* elválasztásnak és továbbtisztításnak vetettünk alá. Az első oszlop esetében kétpumpás, manuális injektálású, *Beckman HPLC* rendszert használtunk *UV*/látható detektorral (*System Gold 166*), míg a következő kettőnél *Waters (Model 510)* rendszert, míg az utolsónál egy speciális *LDC Biochrome* négypumpás komplett *HPLC* egységet.

Az első elválasztás során fordított fázisú (*Reverse phase; RP*) *Vidac C₄* (300Å pórus) oszlopot használtunk (víz/*AcNi*/0,1%-os *TFA* tartalmú elúciós gradiens). Megvizsgáltuk a frakciók biológiai aktivitását és ez alapján a továbbtisztítás céljára a legaktívabbakat kiválasztottuk, az egybeesőket egyesítettük, majd bekonzentrálás után ismét fracionáltuk ugyanazon az oszlopon, ez esetben 0,1%-os heptafluorvajsav /*HFBA*/ tartalmú víz/*AcNi* elúciós gradienssel. A legaktívabb frakciók továbbtisztítására három további oszlopot használtunk: *RP-Vidac C₈*, *Syn. Chrom., Narrow bore C₁₈* oszlopokon víz/*AcNi* /*TFA* tartalmú/ elúciós normál és ún. inverz gradiens alkalmazásával *RP-Altech Adsorbosphere phenyl* (80Å pórus) oszlopot használtunk az eredeti módszer módosításával (Teal és Nachman, 1994). Az elválasztás részletes körülményei a 6. (a-d) ábra megfelelő kromatogramjai alatt találhatók meg. A frakciókat kétpercenként gyűjtöttük automatikusan ill. a két utolsó oszlopnál már manuálisan.

IV/2/5. Szerkezet-meghatározás

A végső tisztítást megelőzően (lsd. előző pont) tájékozódásképpen az aktívnak bizonyuló frakciót gyors atom bombázás tömegspektrometriás (*Fast Atom Bombardment; FAB-MS*) vizsgálatnak vetettük alá. Tekintettel arra, hogy a minta nem bizonyult kellően tisztának ezért szükséges volt egy utolsó tisztítási eljárásra. Az aktív frakciót ezt követően *MS*-el még egyszer megvizsgáltuk, végül pedig standard *Edman*-degradációs módszerrel meghatároztuk az aminosav sorrendet.

IV/2/6. Kompetitív *ELISA* vizsgálatok

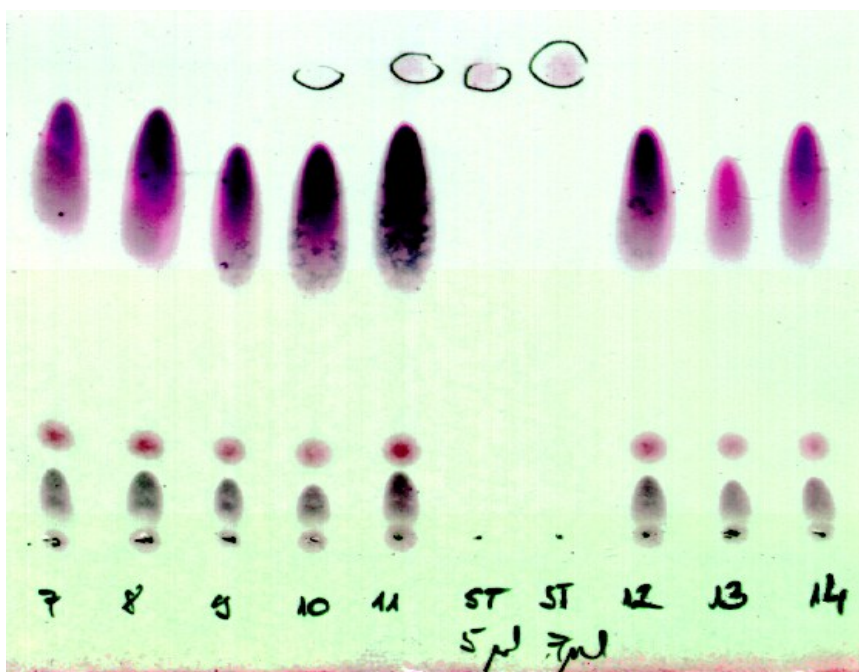
Tekintettel arra, hogy nem sikerült szerkezet meghatározást végezni a *Narrow bore C₁₈* oszlopon történő tisztítást követően néhány, szintén aktívnak mutatkozó frakción, így azokkal legalább a feltételezhető C-terminális végükre vonatkozó hasonlóság miatt –tájékozódás-képpen– egy ún. kompetitív *ELISA* tesztet végeztünk el.

Az *ELISA* tesztek röviden a következőkben foglalhatók össze. Szintetikus *PBAN-Keyhole limpet hemocyanin* komplexet használtunk antiszérum termelésre (immunizálás). Kétszáz µl 0,1 M Na₂CO₃-ot vagy 0,1 M Na₂CO₃ 0,4 pmol tartalmú *Hez-PBAN*-t adtunk a vályúkhhoz és a tálcákat 8°C-on tartottuk egy éjszakán át. Ezt követően a tálcákat háromszor átöblítettük *Tween*-t tartalmazó foszfát puffer sóoldatban (*Phosphate buffered saline; PBS*) (0,15M NaCl 50 mM Na₂HPO₄; pH=7,25; 0,05% *Tween*-20). Minden vályút feltöltöttünk 200 µl-nyi blokkolóval mely 1% zselatint tartalmazott majd 35°C-on 1,5 órán át inkubáltuk *PBS-Tween* mosás előtt. A hígított antitesteket (1:1000 *PBS*-ben) *Hez-PBAN*-nel (0,03-0,30 pmol) vagy a *HPLC* tisztított frakciókkal inkubáltuk (kb. egy agy-*SOG* ekvivalens) 1 órán át 26°C-on gyenge rázással. Inkubációt követően az antitest keveréket hozzáadtuk a vályúkhhoz majd ismét éjszakai inkubáció következett 8°C-on. Végül az *ELISA* tálcákat *PBS-Tween*-el mostuk és 200 µl alkáli-foszfátázzal konjugált *goat anti-rabbit IgGs* (1:2000 steril *PBS*-ben) került hozzáadásra minden vályúhhoz. A tálcákat további 1,5 órán át 35°C-on inkubáltuk, majd háromszor mostuk *PBS-Tween*-ben. Százötven µl 1,0 mg/ml *p*-nitrofenil-foszfát- diethanolamin puffert adtunk a vályúkhhoz és végül a tálcákat egy órán át szobahőmérsékleten tartottuk. A reakció leállítása után a vályúkat 405 nm-en olvastuk le *ELISA* olvasóval.

IV/3. Eredmények

IV/3/1. Alkalmazott *in vivo* biotesztek a *PT* aktivitás vizsgálatára

Új eredményként könyvelhető el és a gyakorlatban igen hasznosnak bizonyult a ***M. brassicae*-ben kidolgozott *PT* aktivitás bioteszt (gyorsteszt), amelynek segítségével *TLC* lapon történő futtatás majd vizualizációval jól értékelhetően teszteltük a klf. tisztított frakciók biológiai aktivitását.** Ezzel a módszerrel kiváltottuk a költséges és munkaigényes *GC*-vel történő feromon-főkomponens (*Z11-16OAc*) vizsgálatát (lsd: **Anyag és Módszer**, IV/2/2.). Egy jellegzetes sorozatvizsgálat (*TLC* lapon) kontrasztosított képe az 5. ábrán látható.



5. ábra: A hormontartalmú tisztított minták *PT* hatásának vizsgálata *TLC* lapokon.

A *PG*-ben termelődött feromon mennyiségét (azaz a tisztított minta biológiai aktivitását) a felvitt 5-7 µl-nyi Z11-16OAc standard (*M. brassicae* feromon főkomponense) alapján határoztuk meg. A sorszámozásból látszik, hogy az egyik vizsgált frakció sorozat 10., de elsősorban 11. számú mintája egyértelmű biológiai aktivitással rendelkezik. A futtató elegy: diklórmétán:toluol; 5:2 volt

IV/3/2. A *Mab-PT* izolációja és meghatározása

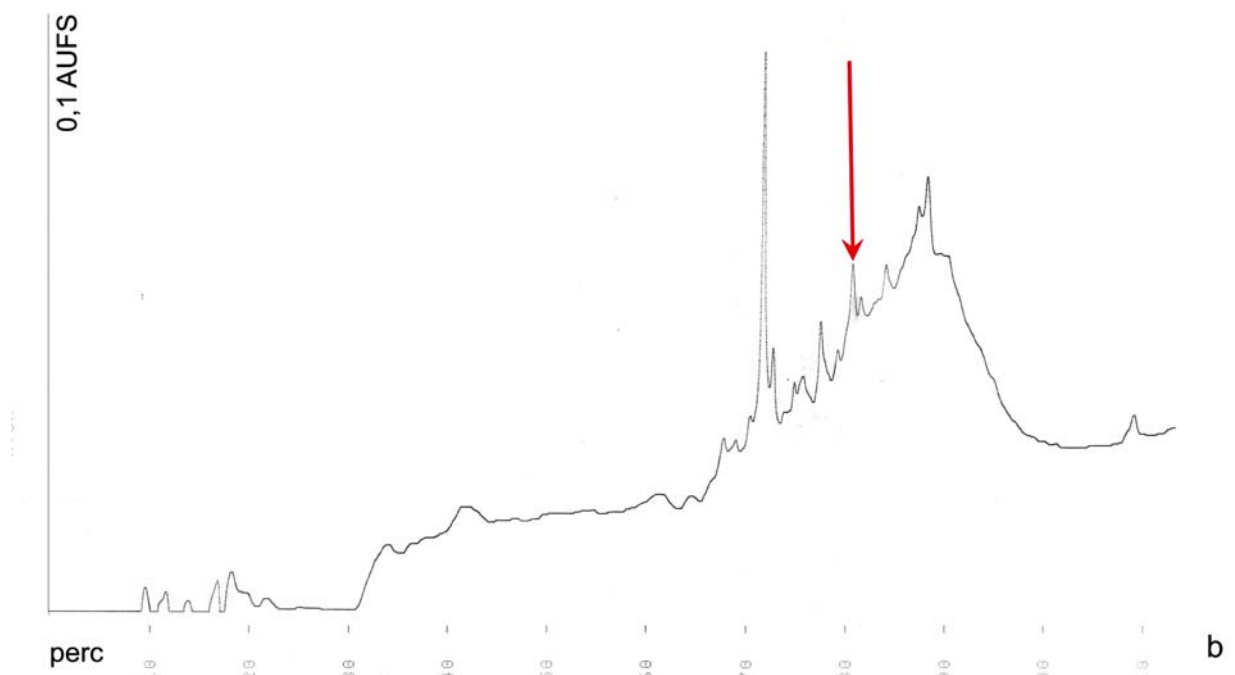
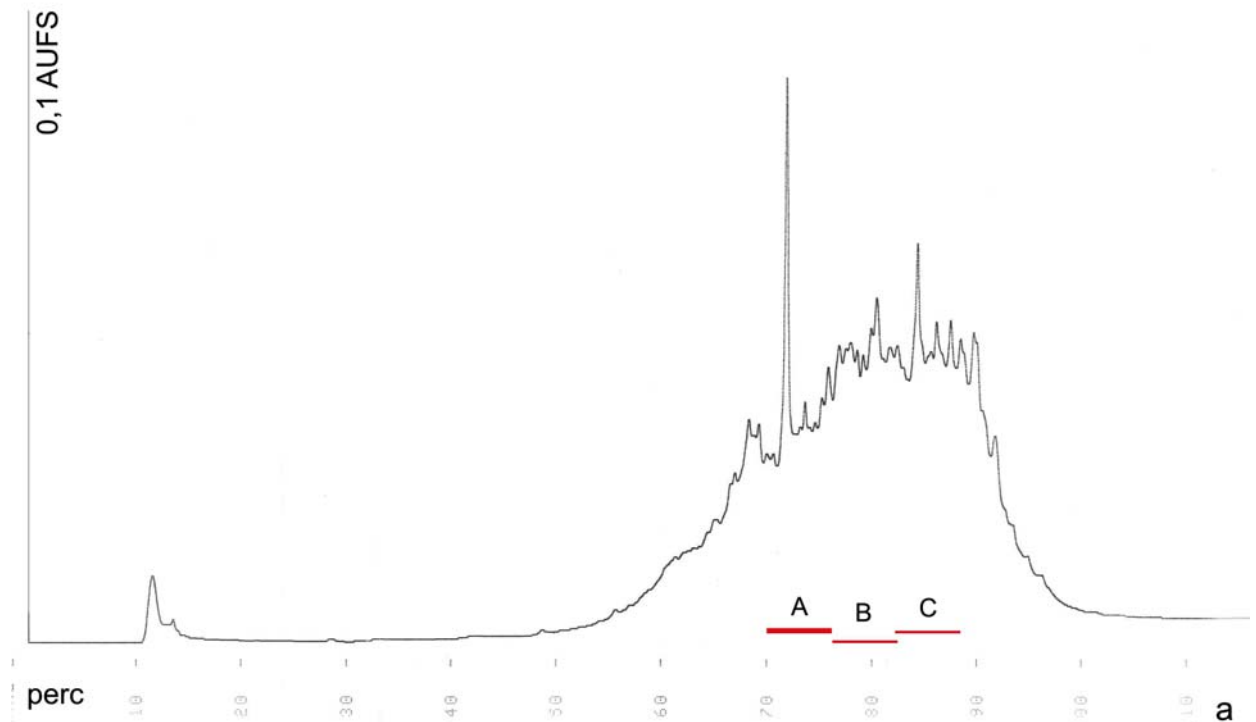
Az agy-*SOG* komplexből a tisztítás és izolálás során több *PT* aktivitással rendelkező frakciót is sikerült találni, de a többlépcsős tisztítási folyamat és a korlátozott mennyiségben rendelkezésre álló extraktum miatt végül csak egyetlen neuropeptidet izoláltunk ill. további hasonló létrehozásához a kompetitív *ELISA* segítségével (ld. IV/3/3.).

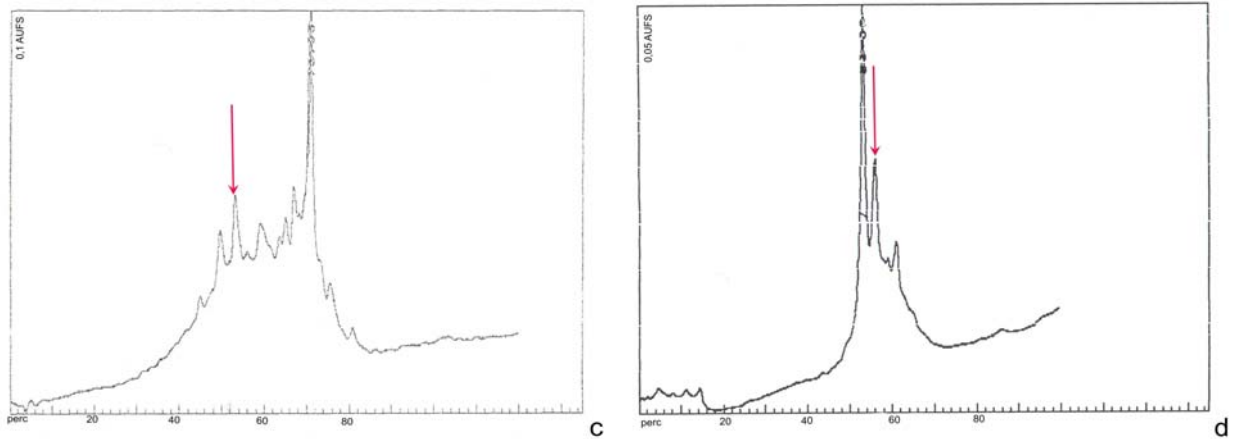
A *Baker WP Carboxyl Acid SPE* tölteten történő tisztítást követően három fő csoportba különítettük a kivonatokat, de biológiai hatását tekintve az 1. csoport (első átfolyás) volt a legaktívabb. Ezért tovább tisztítás szempontjából ez volt a legígéretesebb. Az 1. és a 2. csoportot *Baker WP Butyl C₄* oszlopon tisztítottuk emelkedő *AcNi* koncentrációt alkalmazva a lemosás során (5-100% *AcNi*). Az számozás alapján az 1.20; 1.40; 1.60 ill. a 2:40-es frakciók bizonyultak aktívak. A további tisztítás részletei azonban már csak az „1.40”-es mintán kerül bemutatásra.

Az „1.40”-es mintákat egyesítés után, bekonzentráltuk, majd alávetettük az első *HPLC* tisztításnak. A *Vidac C₄*-es oszlopon *TFA* ionpár-képző alkalmazása esetén a jelölésnek megfelelően további három biológiailag aktív régiót (A, 70-76 perc; B, 76-82 perc; C, 82-88 perc) találtunk (6. a. ábra). Az „A” frakciót továbbtisztítva ugyanezen az oszlopon, de *HFBA*

ionpár-képző használatával egy kimagaslóan aktív frakciót nyertünk (A39;78-79 perc; 6. b. ábra).

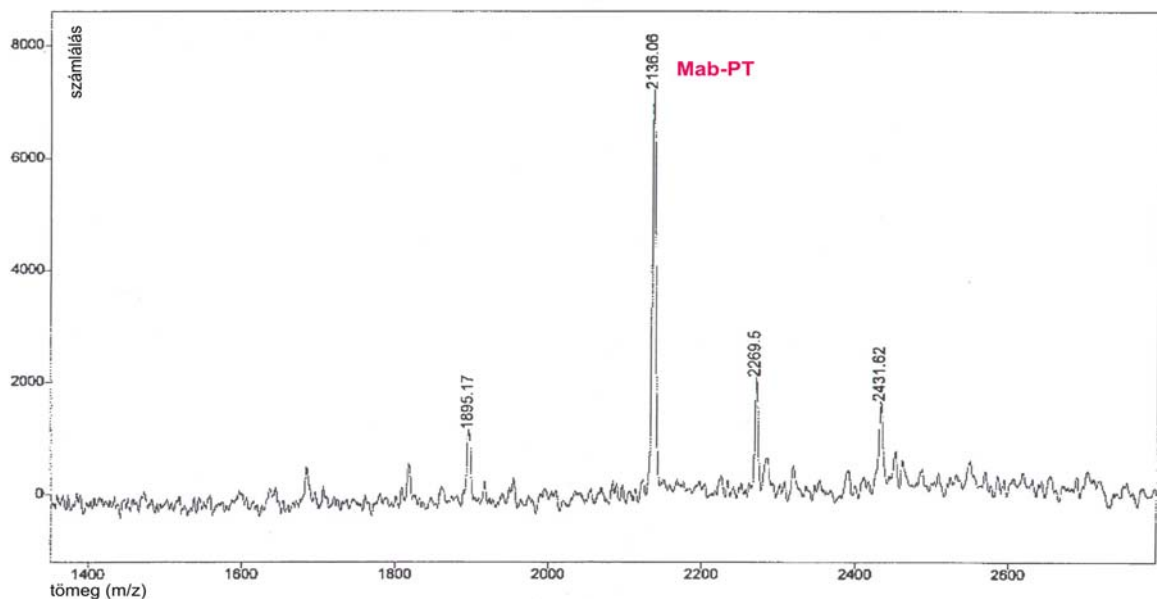
Az „A39” mintát ezt követően egy *Vidac C₈*-as oszlopon tisztítottuk *TFA*-t használva (és a továbbiakban is). Mint azt a 6. c. ábrán jelöltem a „25-26”-os frakció volt aktív (52. perc). Végül a *Syn. Chrom. C₁₈*-as oszlopon futatott mintában a „16” frakció bizonyult aktívnek (54. perc; 6.d. ábra).





6. ábra: *M. brassicae* PT peptid RP-HPLC tisztítási és izolálási folyamat kromatogramjai. UV-detekció: 225 nm a. és b. kromatogramon. a: *Vidac C₄* oszlop (A=5% *AcNi*; B=60% *AcNi* 0,1%TFA; 0-100%B 120 perc alatt; 1ml/perc). b: Az ▲ régió továbbtisztítása *Vidac C₄* oszlopon (A=5% *AcNi*; B=60% *AcNi* 0,1%HFBA; 0-100%B 120 perc alatt; 1ml/perc). UV-detekció: 210 nm c. és d kromatogramon. c: A „39” frakció továbbtisztítása *Vidac C₈* oszlopon (A=15% *AcNi*; B=35% *AcNi* 0,1%TFA; 0-100%B 120 perc alatt; 1ml/perc). d: „25-26” frakció tisztítása *Syn. Chrom. Narrow bore C₁₈* oszlopon (A=15% *AcNi*; B=35% *AcNi* 0,1%TFA; 0-100%B 120 perc alatt; 0,3ml/perc).

A 6. d. ábra „16” frakcióját MS analízisnek vetettük alá, de sajnálatos módon számos szennyeződés nem tette lehetővé a tiszta tömeg spektrum leolvasását, ami egy végső tisztítást tett szükségessé (további jelentős anyagveszteséget okozva). Ezért választottuk az ún. „inverz gradiens” alkalmazását, melynek eredményeképpen tiszta frakciót nyertünk, ami alkalmas volt FAB-MS analízisre, de a pontos aminosav analízishez nem volt már elegendő az anyag.



7. ábra: Az inverz gradiens segítségével véglegesen tisztított Mab-PT FAB-MS-el történő meghatározása.

A peptid **molekulaion tömegét 2137,6 m/z-** nek (*FAB-MS*) állapítottuk meg, ahol egyetlen tiszta csúcs adódott a spektrumon. (7. ábra). A fenti *FAB-MS* eredményt is figyelembe véve *Edman*-degradációval próbáltuk meghatározni az új *PT* peptid szekvenciáját. A javasolt szekvencia a következő (a dőlt betűs aminosavak bizonytalanságot jelölnek):

Mab-PT: SLAYVQKVFEN/EF/PRLamid. (vö.: VI/3/2. Eredmények).

A javasolt aminosav sorrendre azonban a kapott molekulatömeg és más hasonló szekvenciák alapján is következtettünk.

IV/3/3. További *Mab-PT*-k kimutatása kompetitív *ELISA*-val

A fent bemutatott 18 aminosavból álló *Mab-PT*-n kívül **még további biológiailag aktívnak mutakozó frakciókban *ELISA*-val is kimutattunk *PT* peptideket**, ami egyértelműen arra utalt, hogy volt(ak) benne olyan neuropeptid(ek) melynek C-terminális vége *FXPRLamid*.

Pozitív eredményt kaptunk a *Baker WP Butyl C₄* aktív frakciókkal (1.20; 1.40; 1.60 ill. 2:40), továbbá az „1.40”-es továbbtisztításából származó és aktívnak bizonyuló A, B és C frakciókkal. Ezen alapján valamennyi vizsgált frakcióban találtunk olyan peptidet, amelyik a jellegzetes *PK* típusú C-terminális pentapeptiddel rendelkezik, ami egyben közvetett bizonyíték a *Mab-PT* általunk javasolt C-terminális végére is.

IV/4. Megvitatás

A 18 tagú *PT* hatású peptidek körében a meghatározás bejelentése (Fónagy és mtsai., 1996), majd a későbbi közlés idejében is (Fónagy és mtsai., 1998) ez volt az első (és ez a mai napig érvényes érdekes módon!), ténylegesen adultból származó, valódi izoláción és tisztításon alapuló neuropeptid azonosítás. Korábban mindössze a *P. separata* lárvákból izolált 18 tagú *Pss-PT* volt ismert (Matsumoto és mtsai., 1992a), mely szintén hordozza a jól ismert *FXPRLamid* C-terminális pentapeptidet és melynek köszönhetően több bioteszt rendszerben is aktívnak bizonyult, tehát *pleiotropikus*. Teljes *PBAN*-ek tekintetében pedig csak *Hez-PBAN* (Raina és mtsai., 1989), *Bom-PBAN I-II*, (Kitamura és mtsai., 1989, 1990) és a *Lyd-PBAN* (Masler és mtsai., 1994) voltak ismertek és klasszikus kivonási és tisztítási eljárással egyébként azóta sem határoztak meg újabbat. Molekuláris biológiai módszereken alapuló vizsgálatok alapján mindössze a *B. mori*-ban (Sato és mtsai., 1993) és a *H. zea*-ban (Ma és mtsai., 1994)

ismertük a *PBAN*, valamint kapcsolódó peptideket kódoló teljes prekursor protein génjének valószínűsíthető szerkezeteit, melyekre általánosan elmondható, hogy egy α -, β -, *PBAN*-, valamint γ -peptidszakasz egységből áll. Az α -szakasz 7 aminosavból áll, a β -szakasz a 18 aminosavból álló egység, a *PBAN* 33-34 aminosavból, míg a γ -szakasz 8 aminosavból épül fel (2. táblázat). Klónozással és előrejelzéssel azóta ismertté váltak a *H. assulta* (keleti dohány-moly), *M. brassicae*, *Agrotis ypsilon* (ypszilon bagolylepke), *S. litura* és *Plutella xylostella* (káposztamoly) fajok fent nevezett teljes gén szakaszai, így szekvenciájuk is, melyeket a szerzőkkel együtt a 2. táblázaton mutatok be összehasonlítás végett.

Megállapítható, hogy a *Hez-PBAN* és a *Bom-PBAN-I* tényleges aminosav szekvenciája és a klónozás alapján talált szekvencia között nincs különbség. A 18 tagú un. β -szakaszok esetében ilyen jellegű összehasonlításra azonban nincsen lehetőség, mert vagy hagyományos kivonás és aminosav szekvenálási eredmények állnak rendelkezésre (*P. separata*), vagy molekuláris biológiai eszközzel előrejelzett javasolt aminosav szekvenciára vonatkozó adatunk van (lsd. 2. táblázat). Ez alól egyedül a *M. brassicae* a kivétel, ugyanis mindkét módon „meghatározott” szekvenciát ismerjük, de három pozícióban azonban eltérés mutatkozik, de ebből két helyen azonban, esetünkben, az *Edman*-meghatározás mást mutatott ki és csak egy helyen van tényleges bizonytalanság. Sajnálatos, hogy a többi tisztított peptid frakció vizsgálatát/meghatározását nem tudtuk elvégezni pedig az **Eredmények** alapján (IV/3/3.) *ELISA*-val egyértelműen kimutattuk, hogy további *FXPRLamid* végű neuropeptideket vontunk ki, melyek közül egyik-másik bizonyára a fent bemutatott hosszú gén szakasz termékei lehetnek, de az is valószínűsíthető, hogy a *pleiotropikus* hatás révén esetleg primer módon inkább *MT* peptidek. Ezek léteire további bizonyíték a **VI.** fejezetben bemutatott eredmények.

A fentiek alapján és a közismert kereszthatás miatt, megállapítható, hogy sok rovar, –vagy esetünkben például a lepkeféléken belül– hordoz homológ gént mely több, rövidebb-hosszabb C-terminálisan azonos, de funkciójában mégis eltérő neuropeptidet kódol. Szemben a magasabb rendűekkel jónéhány neuropeptid keletkezik akár egyetlen *SOG* *Ns*-ben jelentősebb változtatás nélkül a poszt-transzlációs folyamatban, de hatásuk térben (hím és nőstény közötti különbség) és időben (pl. lárvakori vagy imágó) elkülönül és ezért még az is valószínű, hogy receptoraik igen hasonlóak. A szabályozás tehát akár különböző „osztályozás”, „csomagolás” és „célbajuttatás” révén is befolyásolódik.

Az eredmények fényében érdemes kitekinteni a gyakorlati alkalmazhatóság irányába és ennek köszönhetően a feromon-bioszintézisbe történő beavatkozás reményében a két leg-

α (7 tagú) PT peptid	<i>B. mori</i>	α IIITPKLamide ^b	Kavano és mtsai., (1992)
	<i>H. zea</i>	α VITPKLamide ^b	Ma és mtsai., (1994)
	<i>H. assulta</i>	α VITPKLamide ^b	Choi és mtsai., (1998)
	<i>A. ipsilon</i>	α VITPKLamide ^b	Duportets és mtsai., (1999)
	<i>M. brassicae</i>	α VITPKLamide ^b	Jacquín-Joly és mtsai., (1998)
	<i>S. littoralis</i>	α VITPKLamide ^b	Iglesias és mtsai., (2002)
	<i>P. xylostella</i>	α VITPKLamide ^b	Lee és Boo (2005)
	<i>B. mori</i>	β RSVAKPQTHESLEFIPRLamide ^b	Sato és mtsai., (1993)
	<i>H. zea</i>	β SLAYDDKSFENVFETPRLamide ^b	Ma és mtsai., (1994)
	<i>H. assulta</i>	β SLAYDDKSFENVFETPRLamide ^b	Choi és mtsai., (1998)
β (18 tagú) PT peptid	<i>A. ipsilon</i>	β SLSYEDKMFNDVFETPRLamide ^b	Duportets és mtsai., (1999)
	<i>M. brassicae</i>	β SLAYDDK\FENVFETPRLamide ^b	Jacquín-Joly és mtsai., (1998)
	<i>M. brassicae</i>	β SLAYVQK\FENVFETPRLamide ^a	Fónagy és mtsai., (1998)
	<i>P. separata</i>	β KLSYDDK\FENVFETPRLamide ^a	Matsumoto és mtsai., (1992a)
	<i>S. littoralis</i>	β SLAYDDK\FENVFETPRLamide ^b	Iglesias és mtsai., (2002)
	<i>P. xylostella</i>	β NADEDQQQSVDFITPRLamide ^b	Lee és Boo (2005)
	<i>H. zea</i>	LSDDMPATPADQEMVRODPEQIDSRKTFSPRLamide ^a	Raina és mtsai., (1989)
	<i>H. assulta</i>	LSDDMPATPADQEMVRODPEQIDSRKTFSPRLamide ^b	Choi és mtsai., (1998)
	<i>B. mori</i>	LSDDMPATPADQEMVRODPEQIDSRKTFSPRLamide ^a	Kitamura és mtsai., (1989)
	<i>L. dispar</i>	LADDMPATMADQEVYRPEQIDSRNKYFSPRLamide ^a	Masler és mtsai., (1994)
PBAN peptid	<i>A. ipsilon</i>	LADDTPATPADQEMVRODPEQIDSRKTFSPRLamide ^b	Duportets és mtsai., (1999)
	<i>M. brassicae</i>	LADDMPATPADQEMVRODPEQIDSRKTFSPRLamide ^b	Jacquín-Joly és mtsai., (1998)
	<i>S. littoralis</i>	LADDMPATPADQELVRODPEQIDSRKTFSPRLamide ^b	Iglesias és mtsai., (2002)
	<i>P. xylostella</i>	RLKDSGLAPPDEYRTPELIDARAQYFSPRLamide ^b	Lee és Boo (2005)
	<i>B. mori</i>	γ TMSFSPRLamide ^b	Kavano és mtsai., (1992)
	<i>H. zea</i>	γ TMNFSPLamide ^b	Ma és mtsai., (1994)
	<i>H. assulta</i>	γ TMNFSPLamide ^b	Choi és mtsai., (1998)
	<i>A. ipsilon</i>	γ TMNFSPLamide ^b	Duportets és mtsai., (1999)
	<i>M. brassicae</i>	γ TMNFSPLamide ^b	Jacquín-Joly és mtsai., (1998)
	<i>S. littoralis</i>	γ TMNFSPLamide ^b	Iglesias és mtsai., (2002)
γ (8 tagú) PT peptid	<i>P. xylostella</i>	γ TMNFSPLamide ^b	Lee és Boo (2005)
	<i>B. mori</i>	γ TMSFSPRLamide ^b	Kavano és mtsai., (1992)
	<i>H. zea</i>	γ TMNFSPLamide ^b	Ma és mtsai., (1994)
	<i>H. assulta</i>	γ TMNFSPLamide ^b	Choi és mtsai., (1998)
	<i>A. ipsilon</i>	γ TMNFSPLamide ^b	Duportets és mtsai., (1999)
	<i>M. brassicae</i>	γ TMNFSPLamide ^b	Jacquín-Joly és mtsai., (1998)
	<i>S. littoralis</i>	γ TMNFSPLamide ^b	Iglesias és mtsai., (2002)
	<i>P. xylostella</i>	γ TMNFSPLamide ^b	Lee és Boo (2005)
	<i>B. mori</i>	γ TMSFSPRLamide ^b	Kavano és mtsai., (1992)
	<i>H. zea</i>	γ TMNFSPLamide ^b	Ma és mtsai., (1994)

2. táblázat: A PT/PBAN típusú neuropeptidek. A vastagított karakterek az *FXPRLamide* C-terminális pentapeptidet jelöli.

a felső index: szövetből történő kivonás és tisztítás után hagyományos módon történő aminosav sorrend meghatározással.

b felső index: előrejelzett/valószerűsített szekvencia gén klónozás alapján

ismertebb kutatási irány a *PBAN* peptidomimetikus antagonisták, ill. a *PBAN pszeudopeptid* analógok tervezése és tesztelése. Az első megközelítés és annak szélesebb körű kidolgozása a *Substance P* gerinces neuropeptid analógiája alapján készült (Gilon és mtsai, 1991). A rovar *PBAN/PK* csoportra Altstein és mtsai. (2000) dolgoztak ki eljárást. A peptidlánc meghatározott szakaszának „gyűrűbe zárásán” vagy „fej-láb” ciklizálásán alapuló módszer (*Backbone cyclic neuropeptide-based antagonist; BBC-NBA*) röviden az alábbi lépéseket jelenti:

1). A kívánt funkció (ez esetben feromon-bioszintézis) irányításáért felelős neuropeptid azonosítása; 2). A peptiden belül a legrövidebb szakasz behatárolása, amely a kívánt hatásért felelős (lehetőleg a természetes peptid dózistartományában); 3). Az előző eredmény alapján egy „vezér” antagonistá felfedezése/előállítása; 4). Egy potenciális *BBC* antagonistá előállítása, amely nem agonista hatású; 5). Az antagonistá hatásért felelős struktúra pontos meghatározása; 6). Egy inszekticid prototípus előállítása (szintézis, formázás, kipróbálásra alkalmas stb.) amely kis molekulásúlyú, metabolikusan stabil, kutikulán és/vagy bélen átjut, szelektív hatású, valamint nem utolsósorban költségkímélő. Ez utóbbi elvárásoknak azonban csak olyan molekula szerkezetek tudnak megfelelni, amelyek térszerkezete nem rugalmas/flexibilis, hanem erősen kötött és ezáltal stabil, amit eddig a *BBC* módszerrel értek el legeredményesebben (Gilon és mtsai., 1991).

A másik megközelítés, a *PBAN pszeudopeptid* analóg kifejlesztése Nachman és mtsai. (1996b.) nevéhez fűződik. Az alapkoncepció szerint olyan védelemmel kell ellátni a szintetikus aktív peptidszekvenciát, amelyik megkönnyíti a poláros molekula átjutását az apoláros kutikula lipid mátrixon, valamint ellenáll a bél és vérnyirok peptidázainak. Példaként említendő az az eljárás, amikor kiindulásként az *FTPRLamid* C-terminális aktív szekvenciában a fenilalanin fenil gyűrűjét egy hidrofób karboranil π (2-karboránecetsav; *Cbe*) taggal helyettesítették létrehozva a *Cbe-TPRLamid* molekulát (Nachman és mtsai., 1996b), amely a célállatba injektálva még az eredeti *PBAN* molekulánál is hatásosabbnak bizonyult. További amfifilikus analóg esetében a *hidrocinnamil-TPRLamid* szuperagonista hatást mutatott, míg a *9-fluorén-acetil-FTPRLamid* és a *1-pirénbutiril-FTPRLamid* pedig 20 órán keresztül aktív volt, úgy, hogy a topikális kezelést követően a molekulák kitűnően átjutott a hidrofób kutikulán (Teal és Nachman, 1997). Egy további fejlesztéssel, a környezet terhelése szempontjából az amfifilikus analógoknál még jobb megoldást találtak, különböző *Fa*-k (a rövidebbek hatékonyabban átjutnak a kutikulán), valamint *kolin*-sav beépítésével a peptid láncba (Nachman és mtsai., 2001).

V. ADIPOKINETIKUS NEUROPEPTIDEK

V/1. Előzmények

Az első eredmények arra vonatkozólag, hogy a rovarokban folyó belső anyagcsere eseményei, nevezetesen a szénhidrát mobilizáció a csótányban (Steele, 1961) ill. a zsírok lebontása több sáska fajban hormonális irányítottság alatt állnak (Beenackers, 1969; Mayer és Candy, 1969) már a múlt század hatvanas éveiben nyilvánvalóvá váltak. A CC-ból készített nyers kivonat hatásait vizsgálva *in vitro* ún. glukagon hatására jellemző elváltozást eredményezett a csótányban, hiszen jelentősen megemelkedett a vérnyirok trehalóz szintje, mely alapján *HrTH* „faktornak” is nevezték. Az egyiptomi vándorsáska, *Schistocerca gregaria*, valamint *L. migratoria* sáskákban a mirigy kivonat viszont a lipid szintjét emelte meg a vérnyirokban jelentősen injektlást követően ezért itt adipokinetikus „faktornak” nyilvánították. Ezt követte 1976-ban Stone és mtsai. által 3000 CC feldolgozásával hagyományos elválasztási technikákon alapuló izolációs munkája, melynek eredményeképpen azonosítottak egy decapeptidet –az első metabolikus neuropeptidet–, amit később *Lom-AKH-I*-nek neveztek el. A peptid szerkezete (1. táblázat) jelentős azonosságot mutat a korábban egy rákfajból (*Pandalus borealis*) izolált vörös pigmentációt serkentő neuroepektiddel (*Red pigment-concentrating hormone*; *RPCH*) ezért a később azonosított metabolizmusért felelős neuropeptideket együttesen *AKH/RPCH* családnak is nevezik, bár hatásuk eltérő.

A CC az általában az agy mögött található és az aggyal három pár idegrost köti össze. Többnyire az aorta falán vagy közelében páros kiemelkedésként, vagy dudorként található. Különlegessége, hogy a benne található peptidek miatt kicsit opálos kék színe van, ami mindig segít a lokalizálásban. Az *AKH/RPCH* hormonok a CC ún. „mirigy”-lebenyében, azaz sejtjeiben termelődnek és 200-600 nm-es elektrodenz granulumban mutathatók ki. Számos *AKH* hormon génje is ismert, továbbá a prekursorok és a szintézis útvonala is feltárt (O’ Shea és Rayne, 1992; Rayne és O’Shea, 1994). Minden *AKH* prekúrzorhoz önálló mRNS tartozik így pl. a vándorsáska (*L. migratoria*) három azonosított *AKH*-hez (I-II-III) pl. három *pre-pro-AKH*. A szignál peptidet a megfelelő *AKH* szekvencia ill. az amidáláshoz szükséges G-aminosav követi, végül pedig az ún. *AKH* kapcsolt peptid (*AKH-Precursor related peptide*) zárja, melynek funkciója azonban ismeretlen. A sejtekből történő kiürülés serkentését a vándorsáskában pl. *TK* típusú peptidekkel azonosítják (Nässel és mtsai., 1995) míg mások az oktopamin, valamint a *cAMP* szerepét tartják fontosnak (Pannabecker és Orchard, 1986). Az utóbbiakkal lehet

összefüggésben az a megállapítás, hogy a CC-t beidegző *NCC-II* (*Nervi corporis cardiaci-II*) elektromos ingerlése *AKH* kibocsátáshoz vezet (Orchard és Loghton, 1981). Radioimmunoassay segítségével a vándorsáska *Lom-AKH-I* mennyiségének 15-szörösét mutatták ki ötperces repülést követően, de vérnyirokban potenciálisan előforduló össz mennyiség még mindig jelentősen kevesebb, mint a CC-ből izolálható. Diederer és mtsai. (1992) kimutatták, hogy a folyamatos szintézis jelentős tartalékokat eredményez a CC-ben és érdekes módon a „frissebb” *AKH* kerül kibocsátásra, míg a korábbiak csak raktározódnak. Az *AKH*-ek bontását pl. a dohányyszender (*M. sexta*) a vérnyirokban először egy endopeptidáz végzi, tekintettel arra, hogy mindkét vége „védett” (blokkolt). A hasítást követően inaktív fragmentumok keletkeznek (Fox és Reynolds, 1991). A hormon fél-életidejét fajoktól függően néhány perctől kb. egy órában állapították meg. Különböző életidőt állapítottak meg a három *Lom-AKH*-re is, bár az továbbra is tisztázatlan, hogy egy peptidáz hogyan képes eltérő sebességgel bontani a neuropeptideket, ami inkább több peptidázra utal (Oudejans és mtsai., 1996).

Napjainkban már ötven körüli a feltárt szerkezetű *AKH/RPCH* neuropeptid, melyek közül sok esetben, közel rokon fajoknál, már korábbról ismert szekvenciájú *AKH* került azonosításra (Gäde, 1997; Gäde és mtsai, 1997). A kilencvenes évek folyamán korszerűbb, csak néhány lépcsős tisztítást/elválasztást, kevesebb nyersanyagot igénylő izolációs eljárások kerültek kidolgozásra, melyet szekvenciális *Edman*-degradáción alapuló szerkezet meghatározás, vagy újabban csak *MALDI-ToF MS* vizsgálatok követnek. Az eredmények azt mutatják, hogy amíg a *Pab-RPCH* állandó szerkezettel rendelkezik több rák fajban, addig a rovarokban széles variabilitást mutat. Az *AKH/RPCH* peptidek tagjai 8-10(11) aminosavból állnak és piroglutamát zárja le az N-terminális végen, míg a másik oldalon amidált. Mindig tartalmaznak aromás aminosavat oly módon, hogy a 4-es pozícióban főleg F vagy esetleg Y található és W pedig a 8-as pozícióban. A 8. és 9. helyen előforduló W és G révén egy nem töltött aminosav helyezkedik el, de pl. egyes Kétszárnyúakból, mint az ecetmuslicából D-aminosavat azonosítottak a *Drm-HrTH* 7. helyén, vagy a skarabeusz bogár (*Scarabaeus deludens*) CC kivonatából azonosított *Scd-CC-I*-ben. Szerkezet hatás tanulmányok azt igazolták, hogy az aktivitáshoz a 4-es és 8-as pozícióban található aromás aminosavaknak, továbbá a mindig azonos C- és N-terminális végeknek van döntő szerepük.

A metabolikus hormonok szerepének és az általuk irányított fontos élettani folyamatoknak köszönhetően sok kutatást végeztek a szintetikus azonosított *AKH/RPCH* neuropeptidekkel ill. analógokkal (agonistákkal és/vagy antagonistákkal) (Lee és mtsai., 1996, 1997, 2000). Ezek eredményeképpen ismerjük sokféle hatásukat, mint a lipid vagy szénhidrát mobilizáció,

a *GLP_h* aktivációja és *Fa*-szintézis gátlása stb. (Gäde, 1997; Gäde és mtsai, 1997). Az elmúlt közel húsz évben az *AKH_r*-re vonatkozó ismeretek csak közvetett, farmakológiai *in vitro* kísérletekkel nyertek, aminek köszönhetően magának a neuropeptid csoportnak igen jól ismerjük a zsírtest sejtjeiben (célszerv/-sejt) a hatásmechanizmusát (ld. II/4. (C) alfejezet.) Számos ismerethez jutottak a kutatók a neuropeptidek feltételezett másodlagos szerkezetét illetően –így áttételesen a receptorokra is– spektroszkópiai módszereknek (cirkuláris dikroizmus, mag-mágneses rezonancia), valamint ezen eredmények matematikai modellezésének köszönhetően, (Cusinato és mtsai., 1998; Nair és mtsai., 2001). Specifikus kötődési vizsgálatokat végeztek jelölt endogén *AKH*-el dohányyszenderben és farmakológiai értelemben így jellemezték először az *AKH_r* proteint (Ziegler és mtsai., 1995). Ez utóbbi alapján kifejlesztett kompetitív receptor kötődési próba segítségével állapították azt is meg, hogy a hatáshoz nem elégséges egy aktív váz vagy szakasz (ami sok neuropeptidnél elégséges pl. *PT/PBAN*, *PK* vagy *AT* esetében), hanem az egész molekula konformációja szükséges, ami csak megfelelő aminosavak megfelelő elhelyezkedésével érhető el (pl. ld. aminosavak a 4- és 8-as pozíciókban) (Ziegler és mtsai., 1998).

Az ecetmuslicából és a selyemlepkéből izolálták először úgynevezett reverz fiziológiai módszerrel *AKH_r*-et (Staubli és mtsai., 2002) és megállapították, hogy az receptor hasonlít a gerincesek gonadotropin felszabadító hormon receptorhoz, ami tagja az állatvilágban általánosan előforduló membrán kapcsolt *G_p* receptorok családjának.

Metabolikus neuropeptidek tekintetében kutatásainkat megelőzően számos összefoglaló összegezte a különböző rovar rendekben talált *AKH/RPCH* neuropeptidekre vonatkozó ismereteket, mind kiemelve ezek fontosságát és az ismeretek alkalmazásának elvi és gyakorlati lehetőségeit (Gäde, 1990; Gäde, 1997; Gäde és mtsai, 1997). A lepkék rendjén belül azonban csak nagyon kevés ismerettel rendelkezünk és ezért is tartottuk különösen indokoltnak, hogy egy kártevő fajról próbáljunk meg további ismereteket szerezni.

V/2. Anyag és módszer

V/2/1. Felhasznált rovarok/törzsek

M. brassicae: A tenyésztésre vonatkozó leírást ld. IV/2/1. pontban. A bábok szexálását itt is elvégeztük, azért, hogy a mintavételre, valamint metabolikus (lipid, szénhidrát) biotesztekre minden esetben intakt és ismert korú imágókat (külön hímeket és nőstényeket) használjunk.

L. migratoria: A rovarokat a University of Cape Town (Rondebosch, Dél-Afrika) Zoology Department állatházában tenyésztették ($30 \pm 2^\circ\text{C}$ ~40% *Rh*. 12:12 *L:D*) fűvön és kiegészítőként zabpelyhen. A lipid mobilizációs biotesztekhez ivarérett 3-4 hetes hím állatokat használtunk.

V/2/2. Alkalmazott *in vivo* biotesztek a metabolikus aktivitás vizsgálatára

Az alkalmazott biotesztek a szekvenciálisan és szisztematikusan tisztított biológiai minták metabolikus aktivitásának nyomonkövetését szolgálták először *M. brassicae*, valamint *L. migratoria* imágókban.

Az *AKH/RPCH* neuropeptidek (vagy analógok) jelentős növekedést/csökkenést okozhatnak az injektálást követő 60-90 percben a lipid, valamint glikogén/trehalóz háztartásban, ami a vérnyirokból jól kimutatható. A negatív kontrollhoz vizet, míg a pozitív kontrollhoz *Lom-AKH* nyers kivonat egységeket (standard mennyiségű *aliquot*) használtunk a feltételezett keresztreaktivitás miatt, valamint *Mas-AKH*-t (25 pmol/állat) is. A potrohba történt injektálást (10 µl vizsgálendő minta, 10-15 fej /CC/ ekvivalensnyi) követően, az inkubációs idő elteltével, *BLAUBRAND*[®] 1 µl-es mikropipettával mintát vettünk a vérnyirokból és az alábbi méréseket végeztük el eleinte külön-külön, majd egy mintából egyszerre két paramétert is mértünk párhuzamosan. Egy-egy teszt sorozatot többször megismételtünk és egy-egy mintát legkevesebb három állaton (de többször akár 6-8 állaton is) vizsgáltunk egyszerre (egy csoportot alkottak). Ilyen bioteszteket káposzta bagolylepkében még korábban nem végeztek, ezért a körülményeit, valamint a normál alapértékeket is meg kellett határozni.

- a) Lipidtartalom meghatározás Holwerda és mtsai. (1977) nyomán: A vérnyirokból cc. kénsavval (300 µl; melegítés 100°C -on, majd hűtés) előállított mintákat foszfovanillin reagens hozzáadásával (3 ml; 30 perces sötét előhívás) spektrofotometriásan mértük, 536 nm-en (A kalibrációs görbét koleszterolból készítjük) (Zöllner és Kirsch, 1962).
- b) Trehalóztartalom meghatározás Holwerda és mtsai. (1977) nyomán: A vérnyirokból cc. kénsavval (150 µl) készítjük elő és anthron reagens hozzáadásával (3 ml, melegítés 100°C -on majd jeges fürdő és 30 perces sötét előhívás) határoztuk meg spektrofotométerrel, 585 nm-en. (A kalibrációs görbe D(+) trehalózból készítendő) (Holwerda és mtsai., 1977).
- c) Kombinált meghatározás: A mikropipettával mintát vettünk a fentiek szerint az injektálást követően kb. 75-80 perc múlva. A vérnyirok cseppet 300 µl cc. kénsavba kevertük, majd kettéosztottuk. A lipidtartalom méréshez 150 µl kénsavval kiegészítettük a mintát, majd ezt követően külön-külön a fentiek szerint eljárva meghatároztuk a koncentrációkat (az eredményeket természetesen kétfővel szorozni kellett). Az eredményeket a, b, c-ben *Student* féle *t*-próbával, ($p \geq 0,95$) értékeltük.

d) Lipidtartalom meghatározás *L. migratoria*-ban: A *L. migratoria* hímeket egy együttműködés keretében (DAK-1/00) használtuk a tisztított minták biológiai hatékonyságának vizsgálatára ugyanis a Dél-Afrikai Köztársaság területére élő *M. brassicae* nem vihető be. A tesztelés az előzetes eredmények megerősítését szolgálták, elsősorban a feltételezett keresztreaktivitás miatt (fordított irányban is). A *L. migratoria* egyébként a leggyakrabban használt faj a lipiidháztartás változásainak vizsgálatára.

A vizsgálandó minta beinjektálása előtt (10 µl) –a fenti módszerrel szemben– előbb 1 µl vérnyirok mintát kell venni. Az állatokat, ezt követően, külön-külön tartottuk és az inkubációs idő elteltével a megfelelő állatokból ismét 1 µl-nyi mintát vettünk. A lipidtartalom meghatározását a fentiek szerint elvégeztük. Az adatokat páros *t*-teszttel, ($p \geq 0,99$) értékeltük.

V/2/3. A CC(CA) komplex boncolása, szövet kivonás (*extrakció*) és előtisztítások

A metabolikus neuropeptidek termelődésének (túlnyomó többségben), valamint tárolódásának és kibocsátásának helye a CC. Ezért ilyen hatású neuropeptidek kivonására ez a legalkalmasabb. A mintagyűjtéshez 2-4 napos hímeket, vagy nőstényeket használtunk 50-50 egységekben, összesen mintegy 2000 egyedet. A fejeket levágva, majd letisztítva Matsumoto és mtsai. (1995) által leírt lepke *Ringerbe* (35mM NaCl, 36mM KCl, 12mM CaCl₂, 16mM MgCl₂, 274mM glükóz és 5mM Trisz-HCL; pH=7,5) tűztük le, mely lehetővé tette a kívánt CC szövet (mirigy) feltárását a háti oldalról, majd kiemelését. A CC-ket a 300 µl jégen tartott homogenizáló elegyet (80%-os *MeOH*) tartalmazó *Eppendorf* csövekbe tettük.

A szöveteket tartalmazó egységeket homogenizáltuk, majd szonikáltuk. Ezt követően háromszori centrifugálás (11000 rpm) következett, úgy, hogy az üledéket kétszer 200-200 µl homogenizáló eleggyel átmostuk, kevertük, a felülúszót összegyűjtöttük. A mintákat ezt követően *Speed-Vac*-on beszárítottuk. A nyers kivonatokat is alávetettük bioteszteknek, mely pozitív eredményeket követően folytattuk a tisztítást.

A beszárított kivonatokhoz ezt követően 600 µl 0,1%-os *TFA*-t adtunk, majd a mintát *MILLEX[®] PVDF* (0,45 µm X 13 mm) szűrőn átszűrtük. A *Speed-Vac*-on történő koncentrációt követően *HPLC* frakcionálással folytattuk.

V/2/4. *HPLC* elválasztás és tisztítás

Az elválasztáshoz a már korábban említett kétpumpás, manuális injektálású, *Beckman HPLC* rendszert használtunk *UV/látható* detektorral (*System Gold 166*). Egy *Bioszeparációs Technika* (BST, Budapest) gyártású *Nucleosil 5 RP-C₁₈* oszlopon végeztük az elválasztást Gäde (1985) nyomán. *Víz/AcNi/ 0,11%-osTFA* tartalmú elúciós gradiens alkalmaztunk, míg a futtatás

egyéb körülményei a 8. ábrán láthatók. A percenként gyűjtött 1 ml-es frakciókat automatikusan szedtük le, melyeket beszáritottunk, majd vízben felvettünk és biológiai hatásukat vizsgáltuk. A futtatás kontrolljaként *L. migratoria* CC-ből készült extraktumot (*Lom-AKH*) használtunk.

V/2/5. Szerkezet-meghatározás

A frakcionálás során aktívnak bizonyuló mintát *MALDI-ToF MS* szerkezet-meghatározásnak vetettük alá (Proteomics Research Group, University of Münster, Németország).

V/3. Eredmények

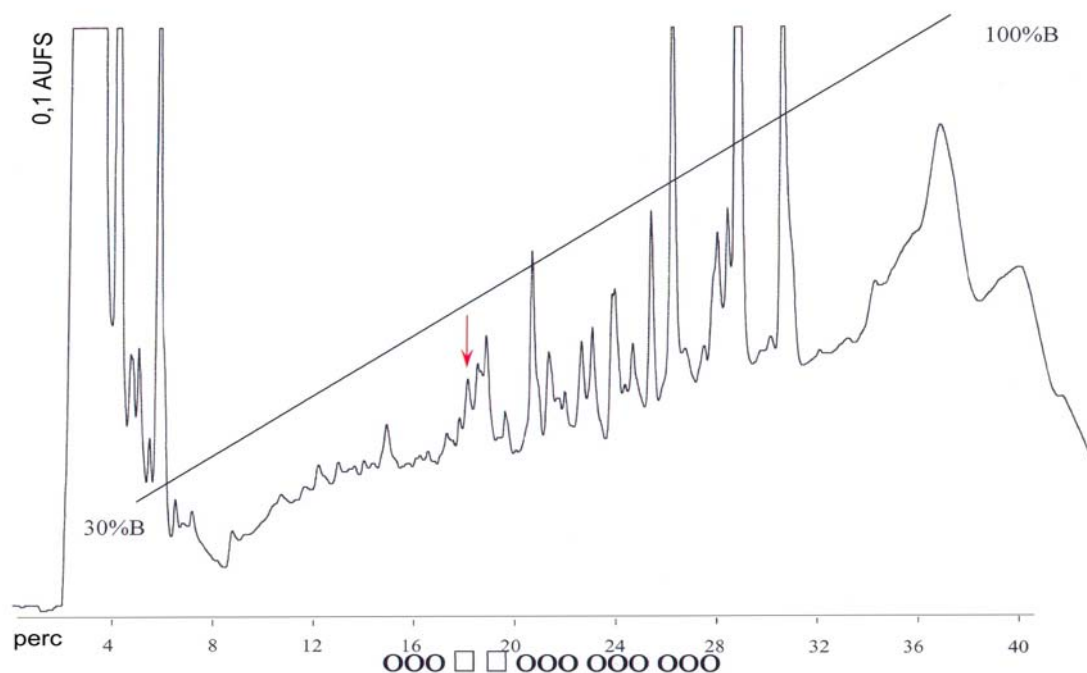
V/3/1. Alkalmazott *in vivo* biotesztek a metabolikus aktivitás vizsgálatára

Leszögezhető, hogy a *M. brassicae*-re átdolgozott bioteszt(ek), mely(ek) a metabolikus változások nyomonkövetésére hivatottak korábban leírt módszer (Holwerda és mtsai., 1977) alapján megfelelőnek bizonyultak. A **kifejlesztett kombinált bioteszt** esetében hangsúlyozandó, hogy ennek a metodikának az a lényege, hogy **egyetlen állatból nyerhetünk többféle –a homeosztázis állapotot jellemző– adatot a vételezett vérnyirok megfelelő, többirányú vizsgálatával** (lipid és trehalóztartalom változás is meghatározható). Maga a módszer, kisebb módosításokkal más rovarokra is alkalmazható, szükség szerint.

Méréseink alapján megállapítottuk, **a lipidtartalom –azaz a $Dg-55 \pm 10 \mu g/\mu l$ körül mozog, míg a trehalóz kontroll értéke $40 \pm 10 \mu g/\mu l$ a vérnyirokban.** A kontrollokban tapasztalt eltérések az egyedek korával ill. nemével magyarázhatók.

V/3/2. A *Mab/(Mas)-AKH* neuropeptid izolációja és meghatározása

A nőtényekből és a hímekből külön-külön készített kivonatokat egy lépcsőben *RP-HPLC*-n szétválasztottuk és a frakciókat biotesztnak vetettük alá. A 8. ábrán látható, hogy **találtunk egy *AKH* jellegű neuropeptidet, ugyanis retenciós ideje jól egyezik a *Mas-AKH*-el** (az első, *Lepidoptera*-ból, pontosabban a *M. sexta*-ból származó és azonosított *AKH*-el, Ziegler és mtsai., 1985). A frakciót először a *M. brassicae* homológ biotesztben vizsgáltuk és igen aktívnak mutatkozott (3. táblázat). Ezt a felfedezést alátámasztják azok az eredmények is, amelyeket ún. heterológ bioteszt rendszerben kaptunk, azaz a kérdéses rész (azaz frakció/k) biológiai aktivitást mutatott a *L. migratoria* lipid mobilizációs tesztben is (4. táblázat) (Fónagy és mtsai., 2002).



8. ábra: A *M. brassicae* CC-CA kivonatának RP-HPLC kromatogramja.

UV-detekció 214 nm. *BST Nucleosil 5 RP-C₁₈* oszlopon (A=víz; B=60% *AcNi* 0,11%TFA; 30-100%B 36 perc alatt; 1ml/perc) Az aktív régiót □-val jelöltem. A piros nyíl a *Mas-AKH* retenciós helyét jelöli.

A közelmúltban végzett *MALDI-ToF MS* szerkezet meghatározások is (azonos „molekula ionok” detektálása révén) igazolták feltevésünket, hogy a *M. brassicae*-ből izolált *AKH* bizonyára megegyezik a *Mas-AKH*-el, mely szerkezet azonos néhány más lepkefajból izoláltéval is. A **molekula ion (*Mas-AKH* Na⁺) tömegét *MALDI-ToF MS* mérés alapján 1030,47 D-nak állapítottuk meg** és így feltételezett szerkezete pedig:

(*Mas*)-*Mab-AKH*: pQLTFTSSWGamid

A CC-ből készített kivonatok frakcióit a szénhidrát (trehalóz) mobilizációs tesztben is megvizsgáltuk *HrTH* vagy *HoTH* hatást keresve, de egyértelmű és következetes hatást vagy eredményt nem sikerült kimutatni az alkalmazott pozitív kontrollhoz képest, így a további kutatást ebbe az irányba nem folytattuk.

<i>Manestra brassicae</i> vércsővek lipidek ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) / $n=4$ vagy 6	Kezeletlen kontroll	Vizes kontroll	Mas-AKH (25 pmol/rovar)
1 napos hím $n=4$	$56,56 \pm 13,99$	$60,34 \pm 7,65$	$78,78 \pm 10,18$
1 napos nőstény $n=4$	$47,06 \pm 8,57$	$53,89 \pm 8,15$	$77,76 \pm 6,79$
2 napos hím $n=6$	$54,03 \pm 12,79$	$44,30 \pm 13,70$	$67,53 \pm 17,52$
2 napos nőstény $n=4$	$65,73 \pm 17,09$	$65,58 \pm 6,98$	$70,21 \pm 13,20$

<i>Manestra brassicae</i> vércsővek lipidek ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) / $n=4$ vagy 6	Vizes kontroll	Lom-CC (0,5 ekv/rovar)	Mab-agy nyers kivonat (8 ekv/rovar)	Mab-CC nyers kivonat (8 ekv/rovar)	Mab-CC 18-19 frakció (12 ekv/rovar)	Mab-CC 20-22 frakció (12 ekv/rovar)
1 napos hím $n=4$	$60,78 \pm 13,80$	$51,58 \pm 13,32$	$60,48 \pm 18,5$	$91,63 \pm 10,22$	$82,32 \pm 17,22$	--
1 napos nőstény $n=4$	$44,81 \pm 1,83$	$55,65 \pm 14,10$	--	$94,99 \pm 15,86$	--	$60,61 \pm 19,20$
2 napos hím $n=6$	$45,30 \pm 6,45$	--	$53,14 \pm 16,2$	$95,72 \pm 13,60$	$75,70 \pm 20,41$	--
2 napos nőstény $n=4$	$63,85 \pm 7,11$	--	--	$88,65 \pm 11,77$	--	$67,18 \pm 12,31$

3. táblázat: Különböző *in vivo* kezelések hatása a káposzta bagolylepke (*M. brassicae*) vércsővek lipid (mobilizált Dg) tartalmára. Pozitív kontroll: Mas-AKH vagy Lom-CC kivonat; Negatív kontroll víz; továbbá Mab-agy és Mab-CC nyers kivonatok valamint RP-HPLC frakciók (jelöléseket lsd. 8. ábrán). Statisztikai analízist Student *féle t* teszttel végeztük, $p \geq 0,95$. A vizes kontrollhoz viszonyított szignifikáns eltérést a piros szín jelöli, míg a nem szignifikánsakat kék.

Kezelések	Vizes kontroll	Lom-CC (0,1 ekv/rovar)	Mab-CC nyers kivonat (12 ekv/rovar)	Mab-agy nyers kivonat (15 ekv/rovar)
<i>Locusta migratoria</i> vércukor				
0 min	23,01 ± 14,61	15,12 ± 4,69	19,51 ± 2,71	21,84 ± 11,64
90 min	29,71 ± 17,75	71,95 ± 14,35	70,84 ± 10,96	36,36 ± 15,43
különbség	6,73 ± 5,50	56,82 ± 9,86	51,33 ± 8,98	14,52 ± 4,69
n	7	7	7	4

Kezelések	Vizes kontroll	Lom-CC (0,1ekv/rovar)	Mab-CC 18-19 frakció (12 ekv/rovar)	Mab-CC 20-22 frakció (15 ekv/rovar)	Mab-CC 23-25 frakció (15 ekv/rovar)	Mab-CC 26-28 frakció (15 ekv/rovar)	Mab-CC 18-19 frakció (15 ekv/rovar)	Mab-CC 20-22 frakció (15 ekv/rovar)
<i>Locusta migratoria</i> vércukor								
0 min	14,76 ± 3,75	19,26 ± 6,05	14,48 ± 9,93	20,07 ± 3,80	20,83 ± 8,23	16,58 ± 4,40	18,23 ± 5,79	13,71 ± 2,30
90 min	18,15 ± 7,38	68,68 ± 10,71	44,98 ± 16,47	26,92 ± 5,40	22,45 ± 9,12	21,59 ± 5,41	30,57 ± 10,45	17,24 ± 6,64
különbség	3,39 ± 2,98	49,42 ± 6,18	30,49 ± 8,02	6,85 ± 5,02	1,60 ± 0,90	5,01 ± 3,24	12,34 ± 6,72	3,5 ± 4,71
n	8	8	8	4	4	4	4	4

4. táblázat: Különböző *in vivo* kezelések hatása a vándorsáska (*Locusta migratoria*) vércukor lipíd (mobilizált *Dg*) tartalmára. Pozitív kontroll: Lom-CC kivonat; Negatív kontroll viz; továbbá *Mab-CC* és *Mab-CC* nyers kivonatok valamint *RP-HPLC* frakciók (jelöléseket lásd. 8. ill. 9. ábrán). Statisztikai analízist páros *t* teszttel végeztük, $p \geq 0,99$. A vizes kontrollhoz viszonyított szignifikáns eltérést a piros szín jelöli, míg a nem szignifikánsakat kék.

V/4. Megvitatás

Mint azt korábbi nagyobb összefoglalókból ismert volt az *AKH/RPCH* neuropeptideket széles körben kutatták (Gäde, 1990; Gäde, 1997; Gäde és mtsai, 1997). Érdekes módon azonban a lepkék rendjén belül még csak néhány eredményes izolációról volt tudomásunk. Egységesen előforduló kilenctagú *Mas-AKH*-t a dohányyszenderben (Ziegler és mtsai., 1985), a kukorica bagolylepkében (*H. zea*) (Jaffe és mtsai., 1986b) vagy a selyemlepkében (*B. mori*) (Ishibashi és mtsai., 1992) ill. később, a bogáncslepkében (*Vanessa cardui*) (Köllisch és mtsai., 1999) is megtalálták. Ez utóbbi fajban azonban azonosítottak egy jelentősen eltérő szerkezetű –*Vac-AKH*– neuropeptidet is (Köllisch és mtsai., 2000). A kukorica bagolylepkéből kivontak egy másik metabolikus peptidet (*Hez-HrTH*), ami inkább a vérnyirok trehalóz szintjét emelte elsődlegesen (Jaffe és mtsai., 1986b). Mind a *Mas-AKH*-hez mind pedig a *Hez-HrTH*-hez hasonló vagy azonos peptidet (fizikai módszerrel megvizsgálva) találtak két további lepkefajban (*Hippoteon eson* és *Imbrasia cytherea*) habár pontos szerkezet meghatározásra nem is került sor (Liebrich és Gäde, 1995).

A fenti eredményeket –hogyanis a *M. brassicae*-ből izolált *AKH* egyezik a *M. sexta*-ból kivontéval– mindössze egy tény vonhatja kétségbe, nevezetesen az, hogy pozitív kontrollként alkalmazott *Mas-AKH* a homológ biotesztekben általában gyengébb aktivitást mutatott (magasabb dózisban is), mint a kivonat vagy tisztított neuropeptid. Ezért felmerülhet a kérdés, hogy esetleg a konformáció kialakításban fontos szerepet játszó (pl. 4. vagy 8. pozícióban található aminosav mégis eltérő lehet, amit viszont a piroglutamát deblokkolás után csak *Edman*-degradációval lehetne meghatározni. A kapott molekulatömeg azonban ellentmond ennek a feltételezett eltérésnek. Ezt a bizonytalanságot eleddig azonban nem sikerült még tisztáznunk.

A gyakorlat szempontjából kiemelt fontosságú lenne ennek a területnek a kutatása, mert a rovarok –jelen esetben egyes mezőgazdasági kártevők– elleni célzott beavatkozásnak egy vonzó területe lehetne a metabolizmusra (ezen keresztül energiaforrásra, felhasználásra) gyakorolt hatás is. Ezeket célozzák azok a gyakorlati alkalmazás igényével született és születő szintetikus *AKH*-k, ahol vagy a C- (Lee és mtsai., 1996) vagy az N-terminális (Lee és mtsai., 1997) végét módosították, de egyetlen aminosav cserével (Ziegler és mtsai., 1998), vagy matematikai modellezés segítségével (Lee és mtsai., 2000) is próbáltak még optimálisabb és hatékonyabb mimetikumot előállítani. Ezek az eredmények azonban elenyészőek ahhoz képest, hogy milyen potenciális terület lehetne ez mind az elmélet mind pedig a gyakorlat számára.

A tudományos eredményeken kívül újdonságnak számít az, hogy sikerült kidolgozni egy kombinált biotestet, amit nem csak klasszikus élettani vizsgálatokhoz lehet alkalmazni, hanem későbbiekben akár hormonanalóg, mimetikumok vagy ismeretlen eredetű szennyeződést tartalmazó környezeti minta (pl. vízminta, vagy talajkivonat) élettani hatásának elemzésére is használható, ami ily módon esetleg „stressz” helyzetet eredményez, vagy annál még súlyosabb következménnyel járhat a rovarban (Székács és mtsai., 2004).

VI. MIOAKTIV NEUROPEPTIDEK

VI/1. Előzmények

A mioaktív peptidek, melyek nem a váz, hanem a jelentős részben saját miogén aktivitással rendelkező zsigeri izmok (pl. viscerális bél izomzat, petevezető izomzata, szívizomzat, vagy *Malpighi*-edények körkörös és hosszanti izomzata stb.) mozgásait befolyásolják. Kicsit részletesebb bemutatásukra itt kerül sor és egyben a jelenleg általánosan elfogadott csoportosításukat is vázolom. A csoport két legfontosabb családja a miotropikus ill. mioinhibitor hatású neuropeptideket foglalja magába.

Miotropinok (*MT*):

a). A *proktolint* és a szív működést serkentő peptideket (*CAP*) különállóknak szokás tekinteni. A *Pea-proktolin* pentapeptid volt az első azonosított rovar neuropeptid (Starratt és Brown, 1975) és igen általánosan előfordul. Később neuromodulátor funkciója is bebizonyosodott. A *CAP* neuropeptideken belül szokás még a *korazoninokat* elkülöníteni. Megjegyezendő, hogy a *CAP* peptidekre szintén az *AKH*-k N-terminális végződése jellemző.

b). A *K*-ken belül *TK*-k szintén többfunkciós peptideket takarnak. A gerincesek köréből jól ismert *Substance P*-vel mutatnak rokonságot (Chang és mtsai., 1971). Ahhoz hasonló C-terminális pentapeptid szekvenciával rendelkeznek (FX_1GX_2Ramid), ami szükséges a *MT* aktivitáshoz. A gerincesek és gerinctelenek köréből egyaránt ismert *TK*-k jól mutatják konzeratív élettani szerepüket (Schoofs és mtsai., 1990a). Az eddig azonosított *TK*-k különféle simaizmok összehúzódásáért, vérnyomás befolyásolásáért, valamint idegi és bél hormonhatás modulációjáért felelősek a gerincesekben. A *Lom-TK*-k utóbél/végbél kontrakciós hatása a rovarokban jól analogizálható a gerincesekben tapasztaltakkal. A *Lom-TK*-k 30%-os, ill. 40%-os

szekvencia-homológiát mutatnak az emlős, valamint kétéltű és hal *TK*-kkal (az ún. *physaelimin* peptid csoport tagjaival).

A miokininek (*MK*) ugyancsak kicsik, 6-13 aminosavból állók. A C-terminális pentapeptid igen konzervatív régió (*FX₁X₂YRamid*). Ide tartozik pl. az *achetakinin*, *leukokinin*.

A *PK*-k C-terminális végét a már ismert *FXPRLamid* szerkezet jellemzi (Holman és mtsai., 1986a). Szerkezet-hatás vizsgálatok megállapították, hogy a *MT* hatásért elsősorban a konzervatív C-terminális pentapeptid aminosav szekvenciája, valamint e szakasz β -I típusú konformációja a felelős (Nachman és mtsai., 1986a; Nachman és mtsai., 1991). Ehhez a szerkezeti csoport tartoznak a már korábban említett *DH*, *PBAN/PT*-k, vagy az *MRCH* is.

A szulfakininek (*SK*) a gerincesekből már ismert gasztrin-kolecisztokinin (*Gastrin-cholecystokinin*; *CCK*) peptidekhez tartoznak, tekintettel arra, hogy jelentős szekvencia és pozicionális homológiát mutatnak a humán gasztrin II-vel (gyomornedv elválasztást, simaizom összehúzódást serkent), a *CCK-8*(vagy *-12*)-vel (pankreáz enzim szekrécióért, továbbá bizonyos kiürülési/kiürítési folyamatokért felelős) és a cöruleinnel (hatása hasonlít a *CCK*-hez).

Jellegzetes *Y(SO₃H)GHMRFamid* C-terminális hexamerrel rendelkeznek. Nem csak szerkezetükben, hanem funkcionálisan is hasonlítanak a gerinces peptidekhez. Az elsőt követően néhány fajból sikerült izolálásuk (Nachman és mtsai. 1986b), de egyes esetekben csupán molekuláris biológiai eszközök segítségével következtetnek jelenlétükre (Nichols és mtsai., 1988). Egy húslégy fajból (*N. bullata*) egyszerre kivont és azonosított két neuropeptid (*Neb-SK-I, -II*) például magasfokú homológiát mutat a vele közeli rokonságban álló ecetmuslicából előrejelzett szekvenciával (Fónagy és mtsai., 1992d). Az *SK*-nak egy másik jellegzetes szerkezeti sajátága van a korábbi *MT* peptidekkel szemben, nevezetesen, hogy a C-terminális végtől számítva az ötös pozícióban nem található F, viszont a C-terminális vég egy másik –nem *MT*– peptidekkel, nevezetesen az *FMRFamid*-okkal mutat hasonlatosságot (lsd. még lentebb).

A *periviscerokininek* a *PSO*-kból, a ventrális idegrendszer mellett található képletekből szabadulnak fel (1. ábra).

c). Léteznek a hím járulékos mirigyet serkentő hormonok, valamint a petefészket, petevezetőt serkentő hormonok ténylegesen a szaporodási folyamatokban játszanak fontos szerepet.

Mioinhibitorok (*MIP*):

a). Az *FMRFamid*-ok az egyik legszélesebb körben kutatott gerinctelen hormonok. Annak ellenére, hogy az „alap” *FMRFamid* (és ennek L analógja az *FLRFamid*) peptid előfordulását

csak puhatestűekben tudták kimutatni (Price és Greenberg, 1977), ilyen végződésű (és értelemszerűen hosszabb) peptidet egyre több állatcsoportból és rovarból sikerült izolálni, ill. immuncitokémiai eszközökkel jelenlétükre következtetni. Érdekes módon azonban egy multifunkcionális peptideket takar és az „összetartozást” elsősorban a tipikus végződés biztosítja. Az *FMRFamid* a puhatestűekben pl. szívműködést gyorsító peptid. Érdemes megemlíteni, hogyha a természetesen előforduló emlős opioid *Met-enkefalin-Arg-Phe* peptidet amidálják akkor képes kiváltani az eredeti *FMRFamid* hatást. Az *FMRFamid*-dal kapcsolatos (*FaRP*) peptidek a gerincesekben endogén opioid antagonistaként működnek.

Rovarokból először a *leukomioszuppresszin* (*Lem-MS*) peptidet izolálták a *L. maderae*-ből, mely szintén ide tartozik és az utóbél spontán összehúzódását gátolta (Holman és mtsai., 1986b). Érdekes módon az *FMRFamid* önmagában nem mutat ilyen hatást. A *S. gregaria*-ból és a *L. migratoria*-ból is izoláltak *MS*-t (ez utóbbi kettő szerkezete azonos!).

A dohányszenderből azonosított *Mas-FLRFamid* peptid szinaptikus modulatorként hat a háti-hosszanti izomban a repülés folyamán (Kingan és mtsai., 1990). A húslégyből izolált és meghatározott *Neb-MS* volt az első ilyen típusú gastrointesztinális peptid a teljes átalakulással fejlődő rovarok közül (Fónagy és mtsai., 1992e).

Molekuláris biológiai módszerekkel egy egész sor *FMRFamid* végződésű peptid jelenlétére lehet következtetni az ecetmuslicában, mely feltételezett szekvenciákat *FMRF cDNS*-el és oligonukleotid próbákkal azonosítottak izolált gén könyvtárból. Ezekből egyet sikerült izolálni és újrászintetizálni (Nambu és mtsai., 1988). Néha egy-egy fajból 6-10 ilyen végződésű molekulát is sikerült azonosítani, pontosabban jelenlétére következtetni, de élettani szerepük igazolása nehezebb, és szinte minden esetben megkérdőjelezhető, vajon tényleg ennyiféle aktív molekulával állunk-e szembe?

b). Az egyéb *MIP*-ek azonban a fentiektől eltérő szerkezettel rendelkeznek, mint pl. a *Lom-MIP*, ami egy *AGWamid* C-terminális véggel rendelkezik és érdekes módon inkább a *Lom-AKH-II*-höz áll közel.

VI/2. Anyag és módszer

VI/2/1. Felhasznált rovarok/törzsek

M. brassicae: A tenyésztésre vonatkozó leírást lsd. IV/2/1. pontban.

Blaberus craniifer (chilei óriáscsótány). A törzsállományt a Budapest Állatkert Rovarházából szereztük be. Imágókat és lárvákat együtt tartottuk ($30\pm 2^{\circ}\text{C}$; $\sim 50\%$ *Rh.*; 12:12, *L:D*), vízzel és

élelemmel (kutyatáp granulátum őrölt mogoróval, friss répa, alma és idény gyümölcsök) *ad libitum* elláttuk.

VI/2/2. Alkalmazott *in vitro* bioteszt a mioaktivitás vizsgálatára

A *B. craniifer* használatára módosított bioteszt a szekvenciálisan és szisztematikusan tisztított biológiai minták mioaktivitásának nyomonkövetését szolgálták egy heterológ (más fajban) rendszerben.

A csótánytenyészetből kiválasztott hím állatot narkotizáltuk, majd felbontottuk. Az utóbél végbél szakaszának izomgyűrűjéből alapvetően Cook és Holman (1978) munkája szerint izolált szervi preparátumot készítettünk. A preparátumot egy 5 ml-es csótány *Ringert* (*Wright* féle sóoldat; Holman és mtsai., 1991) tartalmazó kamrába felfüggesztettük, melyet érzékeny transzducerhez (Leuveni Katolikus Egyetem /Belgium/ elektronikai műhelyében egyedileg gyártották) rögzítettünk. Az utóbbit potenciometriás rekorderhez (*Radelkis*) illesztettük, melynek segítségével a miogramok rögzíthetők, tehát értékelhetők voltak.

A rutin sorozatvizsgálatot Schoofs (1988), valamint Fónagy (1994) nyomán részletesebben leírtak alapján végeztük. Egy-egy beszárított mintát (tisztítottsági foktól függően 10-50 fej ekvivalensnyit tartalmazott) 1 ml csótány *Ringer*-ben oldottunk fel, majd hozzáadtuk a tesztkamrához. Az amplitúdó, a tónus és a frekvenciaváltozást legalább 1 percig vizsgáltuk, majd a kamrát többször átöblítettük és a spontán, normál izomműködés helyreállása után újabb mintát adtunk a kamrához. Pozitív kontrollként szintetikus *Lom-MT-II*-t (Schoofs és mtsai., 1990b) és *Pss-PT*-t (Matsumoto és mtsai., 1992a) használtunk.

VI/2/3. Az agy-SOG boncolása, szövet kivonás (*extrakció*) és előtisztítások

A mintagyűjtéshez ugyanazokat a 2-4 napos *M. brassicae* hímeket, vagy nőstényeket használtunk 50-50 egységekben, melyekből a *CA-CC* komplexeket eltávolítottuk (ld. V/2/3. pont; azaz párhuzamosan gyűjtöttük a kétféle szövetet). Az agy-SOG-kat az 300 µl jégen tartott homogenizáló elegyet (*MeOH*:víz:ecetsav; 100:10:1) tartalmazó *Eppendorf* csövekbe tettük.

A szöveteket tartalmazó egységeket homogenizáltuk, majd szonikáltuk. Ezt követően háromszori centrifugálás (11000 rpm) következett, úgy, hogy az üledéket kétszer 200-200 µl homogenizáló eleggyel átmostuk, kevertük, a felülúszót összegyűjtöttük. A mintákat ezt követően *Speed-Vac*-on beszárítottuk. A nyers kivonatokat is alávetettük bioteszteknek, mely pozitív eredményeket követően folytattuk a tisztítást. A beszárított extraktumokhoz ezt követően 600 µl 0,1%-os *TFA*-t adtunk, majd a mintát *MILLEX[®] PVDF* (0,45 µm X 13 mm)

szűrőn átszűrtük. A *Speed-Vac*-on történő bekonzentrálást követően *HPLC* frakcionálással folytattuk a tisztítást.

VI/2/4. *HPLC* elválasztás és tisztítás

Az elválasztáshoz a már fent említett kétpumpás, manuális injektálású, *Beckman HPLC* rendszert használtunk UV/látható detektorral (*System Gold 166*). Egy *Bioszeparációs Technika (BST)* gyártású *Nucleosil-5 RP-C₁₈* oszlopon végeztük az elválasztást az V/2/4. pontban leírtak szerint. A futtatás körülményei a 9. ábrán láthatók. A percenként gyűjtött egy ml-es frakciókat automatikusan szedtük le, melyeket beszárítottunk majd csótány *Ringer*ben felvettünk és biológiai hatásukat *B. craniifer* utóbél preparátumán vizsgáltuk.

VI/2/5. Szerkezet-meghatározás

A biotesztek során aktívnek (*MT* vagy *MIP*) bizonyuló mintákat az V/2/5. pontban leírtaknak megfelelően szerkezet-meghatározásnak vetettük alá.

VI/3. Eredmények

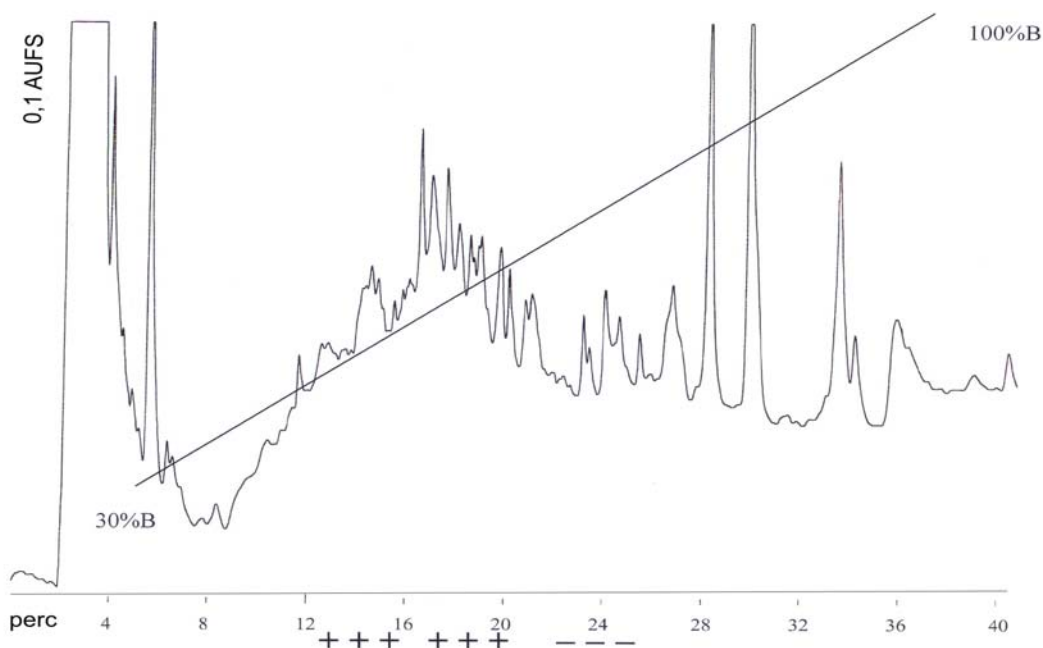
VI/3/1. Alkalmazott *in vitro* bioteszt a mioaktivitás vizsgálatára

Először alkalmaztuk a *B. craniifer* óriáscsótány utóbél preparátumot *in vitro* mioaktivitás nyomonkövetésére. A beállítás során megállapítottuk, hogy a *Lom-MT-II*, valamint a *Pss-PT* szintetikus neuropeptidek 10^{-9} M, ill. 10^{-8} M koncentrációtartományban még aktívak, tehát megbízható módon alkalmas a teszt sorozatvizsgálatra ill. bármilyen biológiailag aktív, a spontán izomműködésre ható biológiai minta vagy szintetikus anyag stb. (farmakológiai jellegű) rutinvizsgálatára.

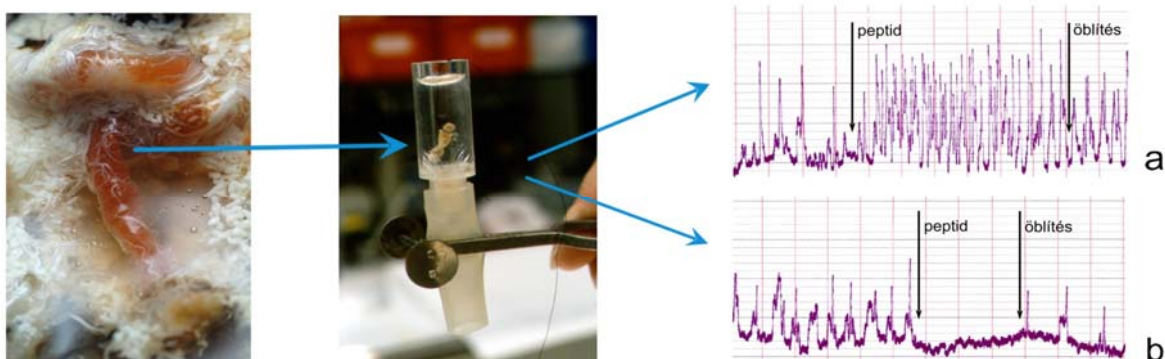
VI/3/2. Mioaktív neuropeptidek frakcionálása, biológiai hatásai és szerkezetük

A nőstényekből és a hímekből külön-külön készített extraktumokat egy lépcsőben *RP-HPLC*-n frakcionáltuk és a beszárított frakciókat biotesztnek vetettük alá. A 9. ábrán bemutatott kromatogramon látható jelölések alapján, **hat MT**, továbbá **három MIP** hatású frakciót találtunk. A 10. a. ábrán a 19. percben gyűjtött minta serkentő, míg a 10. b. ábrán a 24. percben gyűjtött minta gátló hatása látható (Fónagy és mtsai., 2002).

Az elvégzett *MALDI-ToF MS* szerkezet-meghatározások számos ismert és azonosítható „molekulaionok” meglétére engedett következtetni, de sok új is felbukkant, ami megakadályozta az egyértelmű „ujjlenyomatszerű” detektálást és teljes összeolvasást és az alábbiakat tudtunk megállapítani:



9. ábra: A *M. brassicae* agy-SOG komplex kivonatának RP-HPLC kromatogramja. UV-detekció 214 nm. *BST Nucleosil 5 RP-C₁₈* oszlopon (A=víz; B=60% *AcNi* 0,11%TFA; 30-100%B 36 perc alatt; 1ml/perc) Az aktív régiókat jelöltem. A + a serkentő hatású frakciókat míg a – pedig a gátló hatású frakciókat jelöli.



10. ábra: Mioaktivitás bioassay. A *B. craniifer* csótány utóbelének *in situ* bemutatása, majd a kamrában történő elhelyezkedése a preparálást követően.

Az a. ábrán a 8. ábra „19” frakciójának serkentő hatása (tónus, frekvencia és amplitúdó), míg a b. ábrán a „24” frakció erős gátló hatása látható.

Serkentő hatású minták:

Mab-PT (β -PBAN): SLAYVQKVFENVEFVPRLamid molekula tömeg: 2141,99

(vö: IV/3/2. Eredmények)

/Arg⁷/Korazonin H⁺: pQTFQYSRGWTNamid molekula tömeg: 1369,62

Gátló hatású minta:

(Mas)-Mab-FLRFamid-I H⁺: pQDVVHSFLRFamid molekula tömeg: 1229,64

Jelen keretek között további munkákra és megismétlésre megfelelő anyagi eszközök nem álltak rendelkezésre, de reményeink szerint –igaz jelentős késéssel– 2006 év végéig egy újabb együttműködés keretében a fagyasztott minták újbóli *MALDI-ToF MS* vizsgálatokra nyílik lehetőség és jelentősen bővílhet, valamint pontosabbá válhat a lista.

VI/4. Megvitatás

A legklasszikusabbnak számító *in vitro* rovar biotesztet –a madeira csótányban és az amerikai csótány utóbelének spontán aktivitásának befolyásolásához– mioaktív neuropeptidek izolálásához fejlesztették ki, amint ezt Holman és mtsai. (1991) később összefoglalták. Ennek segítségével sikerült a meghatározni korábban a *proktolint* (Starratt és Brown, 1975) is. Ezt később továbbfejlesztették több más zsigeri izomzatra, mint pl. szívcsőre (Konopińská és mtsai., 1986) vagy petevezetőre (Paemen és mtsai., 1991). Ezek a farmakológiai jellegű rovar tesztek igen fontosak, mert alapjait képezik az élettani és hormon-hatásmechanizmus vizsgálatoknak ill. szintetikus analógok (agonisták és antagonisták stb.) fejlesztésében. A *B. craniifer* óriáscsótányon beállított bioteszt nagyon hatékonynak és hasznosnak bizonyult és mindenképpen bővíti a vizsgálati lehetőségeinket. Megjegyezendő, hogy megkíséréltem, hogy magából a káposzta bagolylepke valamelyik zsigeri izomszövetéből készítek preparátumot (pl. ötödik stádiumú lárva beléből is), de még az imágó legígéretebbnek tűnő petefészek/ petevezető szövete sem volt megfelelő mérésre alkalmas izolált szerv készítésére (természetesen lepke *Ringer* alkalmazásával lsd. V/2/3.) a mi eszközeinkkel és főleg a szövetek rendkívüli lágyágából adódóan, ezért végig a heterológ mioaktivitás biotesztet használtuk.

A munkával kapcsolatban kiemelő, hogy a lepkeféléken belül nagyon kevés ismeretünk van a *MT/MIP* neuropeptidekről. Ismerjük a *helikokinin-I, II* (*Hez-K-I, II*) molekulákat, de ezek is elsősorban diuretikus aktivitásúak, ami természetesen viscerális aktivátor szerepükkel van összefüggésben (Blackburn és mtsai., 1995b). Azonosítottak továbbá a dohányyszenderből inhibitorokat (*Mas-MIP-I, II*) (Blackburn és mtsai., 1995a) és *FarP* típusú inhibitorokat is (*Mas-FLRFamid-I, II, III*) (Kingan és mtsai., 1996). Ezeken túlmenően a peptidomika új tudományos módszerével a viaszmolylepke, *Galleria mellonella*, lárvájából a közelmúltban szintén azonosították a *Hez-K-I, II*-t, az (*Arg*⁷)-*korazonint*, egy *PK* típusú (konzervatív C-terminálissal rendelkező) neuropeptidet, valamint *Mas-FLRFamid-I, II*-t az agy-*SOG* komplex nyers kivonatából (Huybrechts és mtsai., 2005). Hasonlóképpen sikerült közel egy tucat már ismert neuropeptid tömegét azonosítani ezzel a módszerrel a dohányszender hímjeiben és nőstényeiben egyaránt, úgy mint *Mas-AKH*, *FLRFamid-I, II, III*, két *CAP*-ot,

három *MIP*-et, végül *korazonint* és *Mas-AST*-t (Audsley és Weaver, 2003). További, hat más ismert *Lepidoptera* peptidet is kimutattak ezekből a mintákból (Audsley és Weaver, 2003).

Munkánkban ötvöztük a klasszikusnak számító tisztítási majd biológiai aktivitás vizsgálatainak lépéseit, valamint a peptidomika adta lehetőségeket még Audsley és Weaver, (2003), valamint Huybrechts és mtsai. (2005) által közzé tett eredmények előtt, igaz eredményeink publikálást csak a megismétlések utánra tervezzük (Fónagy és mtsai., in prep.). Tekintettel arra, hogy *Edman*-degradáción alapuló aminosav meghatározásra nem volt lehetőség ezért –a biológiai hatás és aktivitás révén– célszerűnek látszott a fizikai „meghatározás” módszerét alkalmazni tájékozódás és összehasonlítás végett. Eddigi eredményeink is igazolják, hogy a legfontosabb ismert neuropeptidek egy körültekintő monitorozással –biológiai és szerkezeti szempontból– azonosíthatók és továbbvizsgálva esélyt ad újabbak felfedezésére is. Több minta biológiai aktivitása, valamint a reményeink szerint megismételhető *MALDI-ToF MS* mérések segítségével alaposabban feltérképezhetjük a káposzta bagolylepke legfontosabb neuropeptidjeinek spektrumát. A várható eredmények segítségével pontosabb képünk alakulhat majd ki, a lepkéken belül, egy kártevő faj neuro-endokrinológiájáról.

A mioaktív peptidek kutatása ill. az ismeretek felhasználása ígéretes lehetne, mint arról már esett szó fentebb (V. fejezet) *PBAN/PK -FXPRLamid* C-terminális végű neuropeptidek szintetikus analógjai esetében melyek *pleiotropikusak* lévén *MT* hatásúak is lehetnek (Altstein és mtsai., 2000; Nachman és mtsai., 1996b). Külön említendő, hogy Konopińská 1997-ben mintegy 80 olyan *proktolin* analóg szintéziséről, szerkezet-hatás vizsgálatának eredményéről számolt be egy összegző tanulmányban (*in vitro* rovar, *in vivo* patkány toxikológiai vizsgálatokat is beleértve), amelyben a pentapeptid szekvenciában 1-5 pozícióban történt csere, vagy gyűrűbe zárták, vagy rövidebb-hosszabb peptidláncot kapcsoltak az alapmolekulához. Több rovarfajban, farmakológiai értelemben már karakterizálták a *proktolinr*-t, de azonosítása még nem történt meg. Az analógok vizsgálata is inkább elméleti jelentőségű, mert eddig kutikulán áthaladó és egyéb értelemben is stabilnak mondható analógot nem sikerült előállítani.

A *K*-khoz tartozó molekulák esetében utalni kell a már említett *PBAN/PK* analógokra. Kiemelendő még az inhibitorok közül egy nem peptidtermészetű agonista, a benzetónium klorid (*Bztc*), ami képes az *FLRFamid* végű *MS* molekulákat tökéletesen utánozni több független *in vitro* bioteszt rendszerben (Nachman és mtsai., 1996a). A *Bztc* mérete, funkciós csoportja, térszerkezete töltése révén képes az eredeti neuropeptidet agonizálni, ami újabb bizonyíték a lehetséges, specifikus (heterológ) hatás eléréséhez és beavatkozáshoz, mesterséges úton.

**2. rész: A FEROMON-BIOSZINTÉZISÉNEK HORMONÁLIS
IRÁNYÍTOTTSÁGA ÉS A FOLYAMATOT KÍSÉRŐ SEJTTANI
ESEMÉNYEK BEMUTATÁSA A BOMBYX MORI-BAN, VALAMINT A
MAMESTRA BRASSICAE-BEN**

2. rész Előzmények

Mint azt az **IRODALMI ÁTTEKINTÉS** megfelelő fejezetében (II/4.B már röviden leírtam –elsősorban a lepkék esetében– a sikeres szaporodáshoz elengedhetetlenül szükségesek a fajspecifikus szexferomonok ill. elegyeik (Tamaki, 1985). A hím lepkék, a nőtényeket segítségükkel lokalizálják és így meghatározó szerepük van ezeknek a specifikus anyagoknak a sikeres párzás létrejöttében, azaz a faj fennmaradásában. Érdekes módon a pillangók esetében nem tudunk ilyen anyagokról és az elsődleges kommunikáció vizuális (Shorey és mtsai., 1968).

A terület jelentős irodalmát tekintve Prestwich és Blomquist /eds./, (1987), valamint napjainkban Blomquist és Vogt /eds/ (2003) könyveit kell kiemelni és a legfontosabb általánosságokat az alábbiakban összefoglalom, melyet majd követ a közvetlen előzmények ismertetése az általam vizsgált két fajban.

A szexferomonok a nőtényekben található speciális szervben, a potroh 8-9. szegmensénél –epidermális, gyakran interszegmentális kitüremkedésként a tojócső előtt– található *PG*-ben *de novo* szintetizálódnak olyan *Fa* közti termékekből melyek hossza, kettőskötés helye, sztereokémiája már hasonlatos a végtermékkel. Általános esetben (pl. egy acetát típusú molekulákban) az acetyl-CoA-ból (*AcCoA*) palmitinsav keletkezik (*Fa*-szintetáz; *FaS*) melyet két fontos lépcső követ: láncrövidülés (két szénrel rövidül a lánc, mikroszomális β -oxidáció révén), ill. telítetlen kötések kialakulása. Ezeket a lépéseket a redukció és acetiláció követi. A legtöbb lepke szexferomon alifatikus aldehid, alkohol, acetát, amely 10-18 szénatomos láncot alkot és egy vagy több telítetlen kötést tartalmaz, de ismertek feromon funkciójú epoxidok, ketonok stb. is. A legtöbb szexferomon tehát különböző izomerek keveréke, illetve ún. fő- és alkotkomponensek meghatározott elegye.

Még napjainkig is valójában csupán néhány faj feromon-bioszintézisének útját, lépéseit tanulmányozták teljes részletességgel, mely ismeretek tekintetében szintén a fenti összefoglalókra hivatkozok. Az első szexferomont (*bombykol*; $\Delta^{10,12}$ -hexadekadienoát, pontosabban: E,Z-10,12-hexadekadién-1-ol, 84%; E,E-hexadekadién-1-ol, 16%) az általunk is egyik modell-

fajként használt selyemlepkéből azonosították mintegy félmillió egyed felhasználásával (Butenandt és mtsai., 1959). Azóta sok száz faj feromonját azonosították (Arn és mtsai., 1999). Az összes izolált feromon túlnyomó többsége továbbra is a lepkékből származik (Ridgway és mtsai., 1988).

Az lepkék esetében a párzás mindig az éjjel/nappal ciklus meghatározott idejében van. Ezért a feromonszintézisnek és kibocsátásnak és a hímek percepció képességének is pontos időzítése rendkívüli jelentőségű. Számos élettani és környezeti paraméter befolyásolja a nőstények feromontermelését és kibocsátását (életkor, esetleges korábbi párzás, napszak, napi ritmus, fény és légköri viszonyok). Annak ellenére, hogy a lepkék viszonylag rövid élet-tartamúak, továbbá érett petékkel bújnak elő, azonban mégsem a párzás és az azonnali „kontroll nélküli” szaporodás kerül előtérbe (Cardé és Webster, 1980). Tehát annak érdekében, hogy létrejöjjön a periodicitás a szexuális aktivitásban, olyan mechanizmusok működnek a nőstényekben melyek a külső tényezőket is figyelembe véve belső szabályozást biztosítanak.

Riddiford és Williams (1971) javasolták először a csalogató viselkedés (*calling*) továbbá a szexferomontermelésének neuroendokrin kontrollját a pávaszemes lepkékhez tartozó *Hyalophora cecropia*-nál és *Antheraea polyphemus*-nál. Úgy találták, hogy ezeknél a fajoknál a külső információkat (és változásait) az agyi feldolgozást követően a CC-ből hormonkibocsátódás követi. Későbbi eredmények pedig azt mutatták, hogy csalogató nőstény vérnyirokját injektálva nem csalogató *A. polyphemus* nősténybe párzási aktivitás (csalogató viselkedés) indukálható (Riddiford, 1974). Sajnos ekkor csak a viselkedést figyelték meg és magát a feromontermelést nem mérték. Később igazolódott is, hogy a CC-nak nincsen szerepe a csalogató viselkedés szabályozásában (Sasaki és mtsai., 1983) és tudjuk hogy a feromontermelés és a csalogató viselkedés függetlenül irányított. Például a *H. zea* fotofázisban feromontermelésre serkenthető, de nem mutat párzási aktivitást (Raina és mtsai., 1991). A *M. sexta* esetében a csalogató viselkedés idegi impulzustól függ, de a mirigy kitolása az utolsó potroh ganglion által irányított (Itagaki és Conner, 1986).

Hollander és Yin (1982) a gyapjaslepke, *L. dispar*, esetében úgy találták, hogy az idegrendszer elülső része (az agyat is beleértve) szükséges a feromontermeléshez, kibocsátáshoz, ill. egy sértetlen idegi kapcsolat fontosabb, mint bármilyen hormonális információ (Hollander és Yin, 1985). Azt is bebizonyították, hogy a hasi idegrendszer átvágása az utolsó potroh ganglion előtt jelentősen csökkenti a feromontermelést (Tang és mtsai., 1987). A feromontermelés biológiájának vizsgálataiban az igazi áttörést mégis az a megállapítás hozta, hogy a termelés a *H. zea*-ban egy peptidtermészetű neuroendokrin faktor befolyása alatt áll (Raina és Klun, 1984). Ez,

és későbbi eredmények sora, sokban annak is volt köszönhető, hogy ekkorra sikerült kifejleszteni szenzitív *in vivo* biológiai hatásvizsgálatokat, *PT* aktivitás teszteket. Ennek alapja, hogy kikelt nőstényeket a fej és tor között elkötötték (*ligáció*) majd az így nyert „izolált” potrohba különböző agy és/vagy dúckivonatokat injektáltak. Néhány óra elteltével a *PG*-ből kivonatot készítettek és a feromon-főkomponensének mennyiségét *GC*-vel meghatározták (Raina és Klun, 1984). Ezt váltotta fel később a dekapitálás, amit mi is rendszeresen alkalmazunk, *in vivo* biotesztek során.

A feromonok bioszintézisét, eddigi ismereteink szerint, elsősorban a *PK*-khoz is tartozó jellegzetes *FXPRLamid* C-terminálissal rendelkező *PBAN* serkenti és befolyásolja a célszervben. Az elsőt a *H. zea*-ból izolálták (Jaffe és mtsai., 1986a; Raina és mtsai., 1987, 1989), melyet még számos követett. Az ismert *PBAN*-ek 33-34 aminosavból álló peptidek, az *SOG*-ban termelődnek és időszakosan ürülnek napszaktól függően a *CC*-ből, és/vagy a hasi ganglionokból. A *PT/PBAN* neuropeptideket és a peptidkutatáshoz kapcsolódó előzményeket és saját eredményeimet bővebben az **1. rész IV. fejezetében** tárgyaltam.

A sokféle feromon (és komponensek keveréke) a szénlánc hosszúságától, telítetlen kötőhelyektől és az utóbbiak sztereokémiájától függően szintetizálódik. Azon túlmenően, hogy a lepkék túlnyomó többségénél a *PT/PBAN* közvetlen –a *PG*-re gyakorolt– hatását feltételezzük, kevés ismeretünk van a ténylegesen befolyásolt konkrét bioszintetikus lépésekről.

A *PBAN* hatásmechanizmusának kutatásában elért eredmények ismertetése előtt fontos felvázolnom, hogy abban az időben –bő tíz évvel ezelőtt– milyen kiindulási eredmények álltak rendelkezésre. Tekintettel arra, hogy abban az időben csak közvetett tapasztalataink voltak a rovar-neuropeptidek receptorait illetően, így elképzeléseinket a gerinces irodalomra is alapoztuk. A rendelkezésre álló természetes szintetikus peptideket ill. az azokból származtatott szintetikus analógokat a gerinces farmakológia mintájára sokféle szerkezet-hatásvizsgálatra használták és használják értelemszerűen manapság is. Ezek alapján jutottunk olyan ismeretekhez melyek a minimális hatékony szekvenciát, esetleges aktív konformációt hivatottak leírni. Ezekhez a vizsgálatokhoz is nélkülözhetetlenek a sokat emlegetett biotesztek.

Alapértelmezés szerint a neurohormonok a sejtekre szinte mindig a specifikus receptorral való kapcsolódás után hatnak. A hormon a specifikus receptorhoz kötődik, amely a membrán kötött *AC* (*ATP*-ből *cAMP*-t szintetizál) aktiválásához vezet. Ezt követően megnő a *cAMP* szintje a sejtben és ténylegesen a *cAMP* közvetíti a hormonhatást. A membrán kötött *AC* legalább három egységből áll: a katalitikus proteinből (*C*-protein), guanin nukleotid-kötő regulációs peptidből (*Gp*) és hormon receptor(ok)ból. A klasszikus jelátadás folyamán a hormon

receptorhoz való kötődése után a kötött guanozil-difoszfát (*GDP*) disszociál a *Gp*-ről és újabb guanozil trifoszfátot (*GTP*) köt meg. Ez a katalitikusan aktív komplex végzi a *cAMP* szintézist. A Ca^{++} a ciklikus nukleotidok metabolizmusára és funkciójára hathat a Ca^{++} -kalmodulin komplexen (*CaM*) keresztül, mely utóbbi egy Ca^{++} -függő modulátor fehérje és Ca^{++} -receptor egyben. A *CaM*, a ciklikus nukleotid foszfodiesteráz (pl. hidrolizálja a *cAMP*-t) és a Ca^{++} függő *AC* regulátora és így molekuláris kapcsolatot teremt a ciklikus nukleotidok és a Ca^{++} között. A Ca^{++} sejtben történő felszabadulását (amennyiben nem receptor függő Ca^{++} csatornán keresztül jut be) egyébként egy másik rendszer befolyásolja, az *IP₃* melyet a *PK-C* modulál. A peptidhormonok biológiai aktivitásukat csak bizonyos ideig őrzik meg, inaktiválásukért elsősorban enzimatis hidrolízis (specifikus endopeptidázok, amino- és karboxipeptidázok) a felelősek.

Az *A. velutinana* esetében azon túl, hogy az ún. „burza faktor” is úgy tűnik, hogy szerepet játszik a feromontermelés serkentésében azt találták, hogy a *PBAN* más testi szövetre fejti ki hatását, aminek következtében a *PG* felé fokozódik a *Fa*-szintézishez szükséges alapanyag szállítás, így a megnövekedett szubsztrát mennyiség hat serkentőleg a feromon-bioszintézisre (Tang és mtsai., 1989). Érdekes módon a *H. armigera*-nál is azt találta Soroker és Rafaeli (1989), hogy a hormon már a *de novo Fa*-szintézis előtt/elején fejti ki hatását (ez esetben a *PG*-ben). A *H. zea* fajnál is valószínű, hogy a reguláció (mint fentebb láttuk nem egyértelműen tisztázott úton) a *Fa*-szintézis előtt érvényesül és amennyiben a prekursor(ok) már jelen van(nak) akkor a bioszintézis folyamat lezajlik és be is fejeződik (Jurenka és mtsai., 1991b).

Már a 90-es évek elején is ismertük a részletesebb tanulmányoknak köszönhetően a *bombykol* szintézisének fontosabb mozzanatait (Ando és mtsai., 1988; Arima és mtsai., 1991; Ozawa és mtsai., 1993). Ezen eredmények szerint a telítetlen acil redukciója áll hormonális kontroll alatt. Martinez és mtsai., (1990) és Ozawa és mtsai. (1995) szerint a *S. litura*-nál is a végső redukció áll hormonális befolyás alatt. Jelzett prekursorok használatával végzett vizsgálatok *M. brassicae* (Bestmann és mtsai., 1989) és a dudvarágó aranybagoly, *Chrysodeixis chalcites* (Altstein és mtsai., 1989) fajokban viszont azt valószínűsítették, hogy a hormon elsősorban a Δ -deszaturáz szintjén fejti ki hatását. Később azonban tisztázódott, hogy a *M. brassicae*-ben a *PT/PBAN* elsősorban a *Fa*-szintézis folyamata előtt fejti ki hatását (Jacquin-Joly és mtsai., 1994).

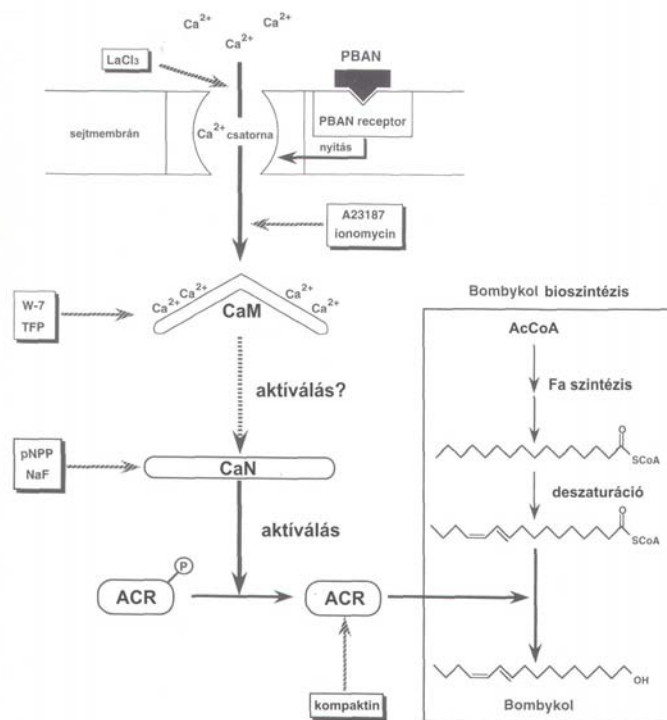
VII. A *PBAN* HATÁSMECHANIZMUSA A *B. MORI*-BAN

VII/1. Előzmények

A *PBAN* szerepének, valamint a kapcsolódó részletes jelátadási folyamat pontos feltárása, ill. az eseményeket kísérő morfológia vizsgálatok előtt részletesen ismertetem a kiindulási alapokat a selyemlepkében.

Fónagy és mtsai. (1992b) megállapították, hogy a selyemlepkében kizárólag a *PG* a *PBAN* függő *de novo* feromon-bioszintézis célszerve. Az *in vivo* és *in vitro* *PBAN* dózis-hatás és idő-hatás vizsgálatok alapján kidolgozott bioteszt rendszer eredményeinek köszönhetően tudtuk, hogy ez a specifikus szerv kitűnő modellként szolgálhat sajátos élettani és biokémiai folyamatok további tisztázásában. Az idő-hatás vizsgálatok eredményei egy gyors konverziót sugallnak, hiszen néhány perccel a kezelést követően már jelentős *bombykol* tartalmat mértünk a *B. mori*-ban –tehát feltehetően a feromon-bioszintézis végső redukciós lépésére hat serkentőleg a hormon–, melyet később Ozawa és mtsai. (1993) farmakológiai eszközökkel be is bizonyítottak.

A rendelkezésre álló biotesztekben végzett farmakológiai vizsgálatok akkori eredményeit az alábbiak szerint foglalhatjuk össze (11. ábra) melyek –a jelen dolgozatban bemutatott– munkám alapjait képezték (Fónagy és mtsai., 1992a,b; Ozawa és mtsai., 1993, 1995; Matsumoto és mtsai., 1995).



11. ábra: A *PBAN* feltételezett jelátadási mechanizmusa a *B. mori* *PG* sejtben a különböző farmakokémikáliák segítségével végzett *in vitro* vizsgálatok szerint (1995-ös állapot).

A teremlést indukálja, serkenti a *Ca* ionophore (*A 23187*) és *ionomycin*, míg a folyamatot gátolja a *LaCl₃*, *W-7*, *TFP*, *pNPP* és *NaF* (Fónagy és mtsai., 1992a,b; Ozawa és mtsai., 1993, 1995; Matsumoto és mtsai., 1995).

A *Ca ionophore* (*A 23187*) (divalens kationok beáramlását serkenti; Pfeiffer és mtsai., 1978) és *ionomycin in vitro* feromontermelést indukált, míg a lantánium ion (La^{+++} ; Ca^{++} antagonista, specifikusan helyettesíti a plazmamembrán divalens kationjait; Weiss, 1974) gátló hatása volt egyértelműen kimutatható. A ciklikus nukleotidok (*cAMP*, *cGMP* vagy *dbcAMP*) beinjektálása a dekapitált *B. mori* nőstényekbe dózis-függő feromontermelést indukált és a *cAMP* mutatkozott a legaktívabbnak. A farmakokémikáliákkal végzett *in vitro* vizsgálatok viszont egyáltalán nem támasztották ezt alá, azt sugallva, hogy a *cAMP*-nek bizonyára nincs közvetlen szerepe a feromontermelés indukációjában. Hasonlóképpen a *MIX* (3-izobutil-1-methylxantin, erős foszfodiesteráz inhibitor; Montague és Cook, 1971) és/vagy a *forskolin* (7-O-hemiszukcinil-7-deacetyl, *AC* stimulátor; Seamon és mtsai., 1981) önmagában szintén nem serkentette a mirigyeket feromontermelésre, miközben a *MIX* képes volt a *Bom-PBAN-I* hatását 30-60%-ban fokozni. A *MIX* és *forskolin* is képes volt növelni a *Ca ionophore* hatását. Ezek az első komplex úttörő *PBAN* hatásmechanizmus vizsgálatok eredményei egyértelműsítették a külső Ca^{++} beáramlás szükségességét és a Ca^{++} *PBAN* jelátadásában betöltött alapvető szerepét. A ciklikus nukleotidok szerepe tehát nem volt bebizonyítható, szemben az *H. zea* esetével, ahol viszont már azt közölték (Rafaeli és Soroker, 1989; Soroker és Rafaeli, 1989; Jurenka és mtsai., 1991b) és ezért ez volt az általánosan elfogadott elmélet a *PBAN* jelátadási mechanizmusban (Raina, 1993), így felfedezéseink már akkor igen figyelemreméltóak voltak és további vizsgálatokat sürgettek.

További farmakológiai ágensekkel végzett *in vitro* vizsgálatok igazolták, hogy mivel se *PK*, se pedig *IP₃* inhibitorok nem akadályozták meg az *in vitro bombykol* termelést (Matsumoto és mtsai., 1995) ezért valószínűleg nem az intracelluláris Ca^{++} mobilizáció játszik szerepet a folyamatban, hanem receptor aktivált Ca^{++} csatornán keresztüli Ca^{++} beáramlás lehet a döntő. Tekintettel arra, hogy *CaM*-inhibitorok (*trifluoperazin*; *TFP* és *W-7*; Cheung, 1980) ellenben nagyon erős gátlószerek bizonyult ezért gyanítható volt a *CaM* kulcsszerepe, valamint az általa aktiválható foszfoprotein-foszfataz (2B)/kalcineurin (*PP2B/CaN*) rendszer részvétele a folyamatban (Matsumoto és mtsai., 1995). Ez utóbbi defoszforiláció révén aktiválja az acil-*CoA*-reduktázt (*ACR*), ami, mint tudjuk a *bombykol* esetében a végső redukciós lépést végzi. Erre bizonyíték volt, hogy a *kompaktin* –egy specifikus 3-hidroxi-3-metilglutaril-koenzim-A-reduktáz (hasonló az *ACR*-hez) inhibitor– is gátolta a *bombykol* szintézisét (Ozawa és mtsai., 1995; Ozawa és Matsumoto, 1996). A *CaM*, valamint a *CaN* tényleges szerepének igazolása a jelátadási folyamatban bizonyításra várt, amit alábbi vizsgálatainkkal elvégeztünk.

A *PBAN* hatásmechanizmusának kibontakozó kutatása mellett igen csekélynek mondható morfológiai megfigyelés és leírás állt rendelkezésre és a feromontermeléssel kapcsolatban,

összefüggésében pedig még annyi sem. A lepkék többségénél (főleg Bombycidae, de Noctuidae és Sphingidae családokon belül is) egy páros epidermális, interszegmentális „zacskó” (*sacculi lateralis*) a feromon-bioszintézis és kibocsátás jól körülhatárolható szerve (Bjostad és mtsai, 1987). A kitüremkedés vérnyirok nyomásának köszönhető és összefüggésben van a fentebb már említett „csalogató” viselkedéssel (Riddiford és Williams, 1971), míg a visszahúzása egyértelműen aktív izommozgásnak köszönhető. Percy-Cunningham és Mac Donald (1987) összefoglalójából tudhatjuk meg a legtöbbet a *PG* morfológiát illetően. A *PG* sejtek hipertrofizálódott, szekréciós módosult kivezetés nélküli sejtek, melyek sok csöves, sima endoplazmatikus retikulummal (*sER*) rendelkeznek (aktív *Fa*-metabolizmus jellegzetességei), valamint sok mikrotestet (*microbodies*) tartalmaznak (Blum, 1985). Lemezes endokutikula, fehérje epikutikula, egy vékony elektrodenz kutikulin és egy külső epikutikula alkotják a mirigyet borító kutikulát (Percy és Weatherson, 1974). Az első, *B. mori*-ra vonatkozó megfigyelések szerint a citoplazmában vakuolumok találhatók (Hayashi és Ito, 1933). Évtizedekkel később Steinbrecht (1964) hisztokémiai vizsgálatok alapján megállapította, hogy ezek nem a *bombykolt* tartalmazzák, hanem telítetlen zsírokat. Ezt követően Waku és Sumitomo (1969) ultrastrukturális vizsgálatokat végeztek és arra a következtetésre jutottak, hogy már a kibúvást megelőző negyedik napon zsírszerű anyagok találhatók a fejlődő *PG* sejtjeiben és jellegzetes mielin struktúrát alkotva kapcsolódnak a mitokondriumokhoz (*Mt*). Kézenfekvő tehát, hogy ezek a zsírszerű anyagok vagy lipidcseppek (*lipid droplet; LD*) és a megfigyelt változások szorosan kapcsolódnak a feromonszintézis folyamatához és joggal feltételezhetjük, hogy mindezek hormonális befolyásoltság alatt is állnak. Ezek alapján nyilvánvalóvá vált, hogy szükséges és érdemes morfológiai és kapcsolódó funkcionális vizsgálatokat végezni a selyemlepke *PG*-ben a feromontermeléssel összefüggésben.

A selyemlepkén végzett kísérleteket a RIKEN Laboratory of Molecular Entomology-ban (Wako-shi, Japán) és egyéb japán együttműködő laboratóriumok segítségével végeztem öt rövidebb-hosszabb, meghívásos (Japán állami, valamint RIKEN) ösztöndíjas út alatt.



Fotó: Nagy Z. László

Selyemlepke (*Bombyx mori*) csalogató nőstény a tenyészedényben

VII/2. Anyag és módszer

VII/2/1. Felhasznált rovar/törzs

B. mori (ShukoxRyuhaku tenyészcsoport): A lárvákat (Katakura Kogyo Co. Ltd., Matsumoto, Japan) hosszú nappalon (16:8; L:D) neveltük 25°C-on félszintetikus, mesterséges tápon. A hímeket és nőstényeket báb állapotban szétválasztottuk és ezt követően külön tartottuk azokat. Vizsgálatokhoz és kísérletekhez különböző korú és/vagy (elő)kezelésű rovaranyagra volt szükség ezért a kiinduláshoz használt állapotukat, vagy szövetet külön-külön megjelölöm a megfelelő alfejezetekben.

VII/2/2. A *Bom-CaM* izolációja, meghatározása és jellemzése

- a) A *PG* szövet gyűjtéséhez egy napos szűz nőstényekből távolítottuk el a mirigyet, úgy, hogy a tojócsővel együtt levágtuk, majd felnyitottuk, szétterítettük, megtisztítottuk (*trimmed*) és homogenizáló elegybe (50mM Trisz-HCl /pH=7,5/; 5mM MgCl₂; 250mM szukróz; 1-1µg/ml *pepstatin A*, *leupeptin* és *aprotinin*, valamint 1mM fenil-metil-szulfonil fluorid; *PMSF*) tettük (500-as *PG* egységekben), jégen. Az üveges homogenizálást követően 10³g-n, 4°C-on centrifugáltuk 10 percig, majd a felülúszót további egy óráig keresztül 10⁵g-n a citoszolikus (mely tartalmazza a *CaM*-ot) és mikroszóma frakció szétválasztására.
- b) A fenti módon nyert homogenátumot *HPLC* tisztításnak és frakcionálásnak vetettük alá. Először azonban egy Trisz-HCl (pH=7,0) pufferrel egyensúlyba hozott *TSK* gél-*DEAE-5PW* ioncserélő oszlopon tisztítottuk az 5ml-nyi citoszol egységeket, NaCl-os Trisz-HCl eluenssel lemostuk több lépcsőben. Ezt követően egy *Senshu-Pak VP-318 HPLC* oszlopon ammonium-acetát eluenst alkalmazva frakcionáltuk. Az elválasztás körülményei a 12.a. ábra alatt találhatók meg. A *CaM* aktivitásának nyomonkövetésére Kakuchi és Yamazaki (1970) által leírt próbát alkalmaztuk mindvégig a tisztítás és elválasztás során.
- c) A *Bom-CaM* tömegét *MALDI-ToF MS*-el határoztuk meg. Tekintettel arra, hogy egy nagymolekuláról van szó a pontos szekvencia meghatározáshoz szükséges volt az izolált *Bom-CaM* emésztésére több enzim által (kimotripszin, endoproteináz Asp-N), valamint kémiai bontásra is (BrCN), Gross (1967) módszere szerint. Emellett párhuzamosan, kontrollképpen elvégeztük a marha-agy (*bovine-brain*) *CaM* emésztését és frakcionálást is. A termékeket *RP-HPLC*-vel (*Pegasil-300 C₈* oszlop) szétválasztottuk, majd ezt követte az aminosav analízis (*Hitachi, L8500*), ill. szekvencia analízis (*Applied Biosystems Model 473A*) Hewick és mtsai. (1981) szerint, végül pedig a részeredményekből a *Bom-CaM* teljes szekvenciájának megállapítása.

d) A megállapított szekvencia alapján megerősítésképpen elvégeztük a peptidszintézist szolid fázisú *Shimadzu PSSM-8-on*, *FmocTM* protokoll szerint (Nokihara, 1994).

VII/2/3. A *CaN* szerepének bizonyítása a *PBAN* jelátadási folyamatában

a) Az *in vitro* *PG* farmakológiai vizsgálatokat alapvetően a korábban kidolgozott módszer szerint végeztük (Fónagy és mtsai., 1992a,b). A frissen kikelt nőtényeket három órán belül dekapitáltuk, majd további egy napig a kísérletek megkezdéséig dobozban tartottuk azokat. A megfelelően kioperált *PG*-t 40 µl *Grace* médiumot, valamint farmakokemikáliát tartalmazó *Eppendorf* csövekbe helyeztük. A farmakokemikáliákat célzottan válogattuk nevezetesen a *cyclosporin A*-t (*CsA*) (Borel és mtsai., 1977) és az *FK 506*-ot (Kino és mtsai., 1987a,b) melyek specifikus és kitűnő *CaN* inhibitorok (Kunz és Hall, 1993; Liu, 1993).

A *Grace* médiumokat tartalmazó *Eppendorf* csövekbe megfelelő koncentrációban *CsA*-t /0,5 µl etanol (*EtOH*):*DMSO* (1:9) elegyben/ vagy *FK 506*-t 1 µl *DMSO*-ban elegyítünk. A kezelés során a *PG*-t 15 percig előkezeltük a megfelelő inhibitorokat tartalmazó *Eppendorf* csövekben, majd ezt követően hozzáadtuk az 5pmol *TKYFSPRLamid* szintetikus rövid peptidet (Matsumoto és mtsai., 1995) vagy *Bom-PBAN-I*-et. A pozitív kontrollban neuropeptid és oldószer, míg a negatív kontrollban csak oldószer volt. A kezelési koncentrációk a 13. a-d. ábrán láthatók. További 90 perces inkubáció (25°C) után kivettük a mirigyeket az *Eppendorf* csövekből, leittattuk, majd a már korábban leírtak szerint az *n*-hexánnal kivont *bombykol* mennyiségét megmértük (Fónagy és mtsai., 1992b).

b) A *CaN* részvételét a jelátadási rendszerben *SDS*-poliakril gél elektroforézis (*PAGE*) általi kimutatással és *Western-blot* analízissel is szándékoztunk megerősíteni. Az *SDS-PAGE* futtatáshoz (Laemmli, 1970) frissen kelt nőtényekből 10-10 *PG*-t boncoltunk ki *Ringer*ben a szokásos módon, majd 15 µl *SDS-PAGE* pufferben főztük. Standard marha-agy *CaN*-t (4300 egység/mg fehérje) hasonló módon készítettünk elő, majd 12%-os gél használva megfuttattuk és *Coomassie* késsel (*R-250*) megfestettük.

A *Western-blot* (*immuno-blot*) antigén azonosítást és meghatározást Towbin és mtsai. (1979) szerint végeztük el és ez esetben is a standard marha-agy *CaN*-t használtuk referenciaként ill. a poliklonális nyúl antitestet is ez ellen termeltették.

c) *PG*-ből származó sejtmentes mikroszóma frakció készítése és tesztelése igazi áttörést jelentett a *PBAN* jelátadási mechanizmusának, de főleg a *bombykol* bioszintézis enzimeinek kutatásában. A VII/2/2. alfejezetben leírt *Bom-CaM* izolációja és jellemzése során a *PG* citoszolikus frakciójára volt szükségünk. Az enzimrendszer kutatásához azonban viszont egy aktív és működőképes mikroszóma frakciót kellett előállítani, mely szubsztrát és „sejtenergia”

hozzáadásával képes *bombykol*t termelni, ami *n*-hexánnal szétválasztható és kivonható a vizes közegből, majd a szokásos módon megmérhető. A módszer fejlesztését és kialakítását röviden összefoglalom, mely csekély számú korábbi, előzetes kísérlet eredményén nyugszik (Wolf és Roelofs, 1983, 1986; Ozawa és Matsumoto, 1996):

A mikroszóma frakció előállításához a korábban leírt módon lepke *Ringer*ben kipreparált *PG*-re volt szükség. Kilencven *PG*-t 1125 µl-nyi homogenizáló elegyben jégen homogenizáltuk, majd kétszer centrifugáltuk (lsd. VII/2/2.). A második centrifugálást követően az üledékkel dolgoztunk tovább, oly módon, hogy előbb 225 µl homogenizáló pufferben reszuszpendáltuk miközben 22,5 µl 7% *CHAPS* /3-(kloramidopropil) dimethylammóni)-1-propánszulfonát/ „detergenst” adtunk a frakcióhoz. Ezt követően állni hagytuk kb 10-12 órán keresztül 4°C-on, majd ismét lecentrifugáltuk (10⁵g). Az így előállított felülúszót (*CHAPS Sup.*) ezt követően fagyaszta tároltuk felhasználásig.

d) A hosszas kísérletezés eredményeképpen a standardizált *CHAPS Sup. bombykol* termelése a következők szerint történik: A végső mikro-teszt 40 µl-nyi végtérfogatú, ami 50mM Trisz-HCl (pH=7,5), 10mM *NADPH*, 2,5mM *ATP* és 0,5mM (*Ac*)*CoA* tartalmú és végül a mikro üvegcsőbe két *PG* ekvivalensnyi *CHAPS Sup.*-ot cseppentünk. Farmakológiai vizsgálatainkhoz 0,5 vagy 1µl *CsA*, *FK 506* (*CaN* inhibitorok), vagy *kompaktin*/-sav (*ACR* inhibitorok) oldatokat cseppentettünk. A *kompaktin*-savat Endo és mtsai. (1976) és Ozawa és mtsai. (1995) módszere alapján állítottuk elő. Összekeverés után szobahőmérsékleten tartottuk először, 15 perc múlva 100 µl *n*-hexánnal felülrétegezzük, majd lefedjük, végül 10-12 óra múlva megmérjük a fentiekben leírt módon a termelődött *bombykol*t. A kezelési koncentrációk a 14. a,b. és 15. a,b. ábrákonn láthatók és az eredményeket statisztikailag is elemeztük.

VII/2/4. A *bombykol* termelő *PG* sejtek azonosítása, izolálása és kultúrában tartása

a) Kísérleteinket ezt megelőzően *in vivo* (injektálással) vagy *in vitro* (pl. *Eppendorf* csőben) körülmények között végeztük, ill. a jelátadási rendszer folyamatának tanulmányozására a *PG*-ből előállított citoszól, vagy mikroszóma frakciókat használtuk. A *bombykol* termelő egysejtrétegű hámot egy módosult kutikula borítja. Célunk volt, hogy a tényleges mirigy sejteket izoláljuk és kultúrában tartsuk, valamint feromontermelési képességüket *PBAN* hatására minél tovább fenntartsuk. Az élő sejtek izolálásához a kutikulát el kellett távolítani, amire egy teljesen egyedülálló módszert fejlesztettünk ki, melynek csak végleges és standardizált változatát írom le:

A frissen kikelt nőtényeket néhány órán belül dekapitáltuk, majd további egy napig dobozokban tároltuk azokat. A potroh végeket 70%-os *EtOH*-ba merítettük, majd steril

eszközökkel, steril lepke *Ringer*ben belboncoltuk a *PG*-t (Matsumoto és mtsai., 1995). A lepedőszerűen szétnyitott szövetet, ezt követően, egy papain tartalmú (1 mg/ml lepke *Ringer*, amit előzőleg *L-cysteinnel* 10 percig előaktiváltunk, továbbá 0,005% *gentamicint* is tartalmazott) cseppre helyeztük (steril *Petri*-csészékben). A kis fedett tálkákban levő szövet preparátumokat kb. 120-140 percig gyenge mozgatás mellett 32°C-on inkubáltuk. A megfelelő idő leteltével (szemészeti csipesz és olló, ill. erre a célra kialakított tű alkalmazásával) kettéválasztottuk az ún. belső (vagy alsó, epidermális mirigysejt) és a külső (vagy felső, kutikula) réteget. Mindkét réteggel ezt követően további vizsgálatokat (biokémiai, morfológiai) végeztünk.

b) Farmakológiai vizsgálatok keretében dózis-hatás vizsgálatokat végeztünk az ún. belső réteg sejtjeivel (kontrollképpen a külső réteget használtuk, valamint egész mirigyet, ill. szétterített, megtisztított *trimmed PG*-t). Ennek keretében megvizsgáltuk a *TKYFSPRLamid* szintetikus rövid peptidet (Matsumoto és mtsai., 1995), valamint az *ionomycin* és a *Ca ionophore A23187* hatásait Fónagy és mtsai., (1992a) leírása szerint. A kísérleti médium azonban mindvégig a lepke *Ringer* volt és nem, a korábban használt *Grace* médium. A kezelési koncentrációk a 17. a-c. ábrán láthatók.

c) Az emésztéssel külön választott belső sejtréteget, (ami inkább tekinthető lazán kapcsolódó sejt halmazoknak) élő kultúrában igyekeztünk tartani és számos körülménnyel kísérleteztünk. A több napos kultúrában tartáshoz azonban a *Grace* médium bizonyult a legmegfelelőbbnek (28°C-on), dacára a leemésztési folyamatban tapasztalt negatív hatásoknak. Az öt napos sejtekből a fenti VII/2/3 c. pontban leírtaknak megfelelően *CHAPS Sup.*-ot készítettünk és *bombykol* termelő képességét is fentiekkel megegyezően vizsgáltuk.

VII/2/5. A *bombykol* termelő *PG* sejtek fluoreszcenz mikroszkópos vizsgálata, valamint jellegzetes sejttani dinamizmusa és a folyamat *PBAN* általi befolyásoltsága

a) A szép és igényes (fluoreszcenz) mikroszkópos vizsgálatokhoz, valamint a *LD*-k megfelelő tanulmányozásához és a *PG* sejtszintű megismeréséhez (pl. sejtszámláláshoz) az előzőekben leírt (ld. VII/2/4 a.) módon szétválasztottuk a *PG* feromontermelő sejtréteget a kutikulától. Ehhez frissen kelt, majd dekapitált, egy napos nőtényeket használtunk. A szétválasztott réteget többször *PBS* cseppekben „átmostuk”. Az utolsó alkalommal 2,5-szeresre hígított 10%-os formaldehiddel cseréltük le a cseppet a tárgylemezen és így tíz percig fixáltuk a szövetet. A fixáló eltávolítása után további három alkalommal átmostuk *PBS*-el.

Az *LD*-k szelektív, sejten belüli festéséhez ún. *Nilus*-vöröset használtunk (6 µl telített acetone oldat 100 µl *PBS* csepphez) (Greenspan és mtsai., 1985). A tárgylemezeket ezt követően

kb. tíz percig sötétben tartottuk („előhívás”). Végül ismét kétszer átmostuk a festett szövetet, majd lefedtük és lezártuk. Az ún. dupla festéshez (sejtmag-festés és *LD*-festés) még *Hoechts* 33342 (1 mg/ml törzsoldat) festéket is adtunk 1/2000 arányban. A sejtszámláláshoz elsősorban csak *Hoechts* festéssel megfestett szövetet használtunk. Sejtszámlálást és a *PG* szövet sejtszintű rajzát számos preparátum felhasználásával készítettük el.

A fluoreszcensz mikroszkópiához (és fényképezéshez) egy *OLYMPUS*[®] *BX-60*-as mikroszkópot használtunk egy *PM-30*-as expozíciós egységgel, valamint egy *BH-20-RFL-T3* által gerjesztett fényforrást. A *Nilus*-vörös (élénk vörös-sárga) és/vagy a *Hoechts* (élénk kék) szín egyidejűleg látható a következő spektrális körülmények között: 330-385 nm sáv interferencia gerjesztő szűrő, 400 nm-es kettős tükör, valamint 420 nm-es felfogó szűrő kombináció esetén (*OLYMPUS*[®] *WU* tubus). A fényképezéshez *KODAK Chrome EL-2400 ASA*-s filmet használtunk.

b) Az *LD*-k dinamikus változásain túlmenően (kontroll körülmények között) a *PBAN* szerepének tisztázása is érdekelt bennünket ezért különböző kezelésű ill. állapotú mirigyeket is megfigyeltünk. A legfontosabb kérdés továbbá az, volt, hogy vajon a dekapitálás mit eredményez. Erre a kérdésre a szokásos módon dekapitált nőstények *PG*-jét vizsgáltuk a fentiek szerint (legalább három napon keresztül). A következő vizsgálatokban dekapitált (36 h és 60 h) potrohba klasszikus *in vivo* módon háromszor egymás után, 4-4 h különbséggel *Bom-PBAN-I*-et (1-1 pmol) injektáltunk, végül az utolsó kezelést követően négy órával preparáltuk és vizsgáltuk a *PG*-t. A kontrollokba csak desztillált vizet injektáltunk. Végezetül olyan mirigyeket is vizsgáltunk több időpontban, ahol az egy napos nőstényeknek lehetővé tettük a párosodást hasonló korú hímekkel.

d) A *PG* sejtekben feltűnő mennyiségű *LD*-t találtunk előzetes vizsgálataink során és feltételeztük –igaz, csekély számú rendelkezésünkre álló szakirodalom alapján–, hogy ezeknek minden bizonnyal közük lehet a feromon előanyagaihoz és/vagy köztitermékekhez. Mivel tudtuk, hogy ezek a zsírszerű anyagok, már bábállapotban is kimutathatók ezért érdemesnek tartottuk, hogy hosszabb időn keresztül megfigyeljük és leírjuk változásukat. Ezekhez a vizsgálatokhoz kelés előtti (1, 2, 3 napos) bábokat használtunk (a kormeghatározást morfológiai és elszíneződési bélyegek alapján végeztük; Fónagy és mtsai., 2001), valamint a kelés napján („0” napos) és további négy napon keresztül négy óránként *PG* szövetmintát vettünk, valamint ezzel párhuzamosan azonos korú állatokból *bombykol* mérést is végeztünk. Tudni kell, hogy a *bombykol* termelés (és annak napi csúcsa is) a fényperiódusra esik ezért mintavételezésre is ekkor kerül sor, melynek pontos részletei a 20-24. ábrákon láthatók.

Az *LD*-k tanulmányozásához azonban a könnyebben kivitelezhető módszert, a teljesen szétterített (de nem szétválasztott) *PG*-t használtuk, melyet csak *Nilus*-vörössel festettük meg. Minden időpontban legalább három külön preparátumot készítettünk és minimum 15 külön fényképet. Az *LD*-k számolásához egy 108x74 µm-es keretet használtunk fel, amin belül természetesen a cseppek átmérőjét is lemértük.

VII/2/6. A *bombykol* termelő *PG* sejtek ultrastruktúrális vizsgálata, jellegzetes dinamikus folyamatok feltérképezése és leírása

a) Az elektronmikroszkópos vizsgálatok előtt hagyományos fénymikroszkópos megfigyeléseket is végeztünk gyakorlatilag a fentebb említett módon kipreparált *PG*-kkel, melyeket azonban nem festettünk meg. Vizsgálatainkat a kelést megelőző három nappal kezdtük (kormeghatározást lsd. korábban: VII/2/5.d.) és a kelést követő ideig folytattunk. A fénymikroszkópos képek nyeréséhez a fenti mikroszkópot (fényképezőgép feltétellel) használtuk normál fényforrással, 1000x-es nagyítással.

b) Az elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz a szövetet alapvetően Waku és Sumitomo (1969) szerint készítettük elő főleg kelést megelőző bábokból ill. röviddel a kelést követően. A megtisztított és szétterített *PG*-t *PBS*-ben, 50 mM-os kakodilát pufferben (pH=7,4; 0,17 M-os szukrózt és 5% glutáraldehidet is tartalmazott) fixáltuk fél napon át 4°C-on. Pufferben tovább áztattuk, majd utófixáltuk 1 %-os ozmium tetroxidban (1 h), végül *EtOH* sorozatban dehidráltuk a szöveteket. A mintákat *Quetol 812*-be ágyaztuk. Az ultravékony metszeteket (100 nm) *LKB* ultramikrotómmal készítettük. A rézrácsra helyezést követően telített uranil-acetáttal, majd *Reynolds*-féle ólom citráttal „festettük” (*Reynolds*, 1963). Megfigyeléseinket és felvételeket *JEOL 1200EX* elektronmikroszkópon végeztük. A sejttani folyamatokat bemutató összefoglaló modell rajzokat számos preparátumról készült felvétel segítségével készítettük el.

VII/2/7. A *bombykol* termelő *PG* sejtek citoplazmatikus *LD*-k kémiai elemzése

a) A *PG*-kben található nagymennyiségű és dinamikusán változó *LD*-k további vizsgálatában kézenfekvő volt, hogy meghatározzuk a benne található lipid természetű anyagok összetételét és ezen keresztül megállapítsuk tényleges szerepüket a folyamatban. A *PG* mintákat általában a fenti, VII/2/5. alfejezetben alkalmazott időkből vettük azért, hogy a várható eredmények jól egybeessenek a morfológiai megfigyelésekkel.

Először egy megbízható kivonási módot kellett kidolgoznunk. Ezért számos szerves oldószert (és időt) és lehetőséget kipróbáltunk (részletesen lsd: *Matsumoto és mtsai.*, 2002), melyek hatékonyságát, a szintén fenti (VII/2/5.) alfejezetben ismertetett *Nilus*-vörös

fluoreszcenz festéssel ellenőriztük. Végül a következő eljárást választottuk: 20 µl acetona helyezzük a *PG*-t felnyitott, tisztított állapotban tíz percig, majd a szövetet kivéve az üveg csövecskében N_2 alatt, beszárítottuk a kivonatot. (Megjegyzés: Az analitikai munkához általában, arányosan több, legalább 5 db *PG*-t használtunk az azonos korú állatokból).

b) A beszárított mintákat *n*-hexánban felvettük és a nem-poláros zsírok *HPLC*-s (*Shimadzu* rendszer) elválasztására egy *Senshu-Pak PEGASIL* szilika (120-5) oszlopra vittük fel, melyet *n*-hexán:ecetsav (99:1) eleggyel hoztunk egyensúlyba, majd húsz perces lineáris gradienssel *n*-hexán:izopropanol:ecetsav (96:3:1) eluenssel lemostuk (1ml/perc). Az érzékelést 230 nm-en hagyományos *UV*-detektorral, valamint egy porlasztásos fényszórásos detektorral is (*Evaporative Light Scattering Detector /ELSD/; SEDEX 75*) párhuzamosan végeztük (45°C; 2 bar nyomás). Elvégeztük a poláros lipidek futtatását is (természetesen más körülmények között; Matsumoto és mtsai., 2002), de tekintettel arra, hogy bebizonyosodott, hogy ez utóbbiak nem mutatnak mennyiségi változást a bábból való kikelést megelőző és kelési napok között, szemben a nem-poláros zsírokkal, ezért ezekről itt bővebben nem írok. Standardok segítségével, valamint még szilika *TLC*-vel is megállapítottuk, a mennyiségi változást mutató csúcsok egyértelműen a *LD*-kből származó *Tg*-k, ezért ezek részletes mennyiségi és minőségi vizsgálatát végeztük el a továbbiakban.

c) A nem-poláros zsírokat tartalmazó előtisztított és manuálisan összegyűjtött *Tg* kivonatokat továbbtisztítottuk egy normál fázisú *Senshu-C₂₂* oszlopon melyet először egy *AcNi:EtOH* (6:4) eleggyel hoztunk egyensúlyba, melyet egy órás lineáris gradiens futtatás követett *AcNi:EtOH* (2:8) arányt eredményezve (1,5 ml/perc). Az érzékelést hagyományos *UV*-detektorral (230 nm), valamint a fent említett *ELSD*-detektorral (36°C 3,5 bar) is párhuzamosan végeztük, hiszen a kromofórral nem rendelkező molekulákat csak *ELSD*-vel „láthatjuk”. A relatív mennyiségi változások nyomonkövetését hét napon keresztül végeztük el a 32. a-c. ábrákon feltüntetett időkben és pontosan azonos (0,2 *PG* ekvivalens) egységeken. Egy adott időpontban legalább két független eredmény (futtatás) állt rendelkezésünkre. A 31. ábrán láthatók azok a jellegzetes csúcsok, melyeket számokkal és betűkkel láttunk el, majd csoportosításukat követően ábrázoltuk az adott csúcsok változásait.

d) A *Tg*-k mennyiségi változásának nyomonkövetése után szükségessé vált a *HPLC*-vel szétválasztott rendkívül karakterisztikus csúcsok/frakciók manuális gyűjtése továbbtisztítása, majd szerkezeti meghatározása *FAB-MS*-el, valamint *MS-MS*-el. A legrészletesebb minőségi analízisekhez olyan időben vettünk *PG* mintát, amikor az előző pontban leírt mennyiségi eredmények alapján legnagyobb mennyiségben fordultak elő az egyes komponensek, azaz a kelést követően 48 órával (ld. 32 a-c. ábra).

A kézzel gyűjtött mintákat beszárítottuk, majd *n*-hexánban ismét felvettük, végezetül pedig egy további normál fázisú *HPLC* tisztításnak vetettük alá. Ehhez ismét a *Senshu-Pak PEGASIL* szilika (120-5) oszlopot használtuk, de *n*-hexán:etilacetát (98,5:1,5) eluens rendszert alkalmazva izokratikus körülmények között (1,5 ml/perc).

A *FAB-MS* ill. *MS-MS* vizsgálatokat egy *JEOL (JMS HX/HX-110A)* tandem *MS* rendszeren végeztük. A módszer és beállítások részletes leírásától eltekintek, mely megtalálható Matsumoto és mtsai. (2002) közleményében, mely alapvetően Tomer és mtsai. (1983) és Adams (1990) közleményein nyugszik. A kiértékelésnél felhasználtuk a rendelkezésünkre álló elméleti számított tömegeit a számba jöhető C_{14-18} telített és telítetlen *Fa*-knak, mely sokban megkönnyítette a csúcsok azonosítását az eredmények rendszerezését az egyébként száz-as nagyságrendű minták esetében.

A *Tg*-ket alkotó *Fa*-k azonosítása után már csak az volt kérdéses, hogy az egyébként mindössze ötféle *Fa* (ld. **Eredmények**), vajon melyik hely(ek)en található (*Sn*-1,-2 vagy -3), valamint főképpen az, hogy az azonosított $\Delta^{10,12}$ -hexadekadienoát (5. táblázat), ami a *bombykol* előanyaga, melyik pozíciókban fordul elő. Ennek eldöntéséhez disznó pankreáz *L* általi emésztési eljárást használtunk Brockerhoff (1975) szerint, miután és 25 db. *PG*-ből *HPLC*-vel tisztított *Tg* frakciót használtunk. Az eljárás röviden a következő:

A mintákat 200 μ l 1 M-os Trisz-HCl (pH=8,0) pufferben inkubáltuk (1 percig, 40°C-on, valamint 0,2% vízmentes $CaCl_2$ -ot és 0,01% epesavat tartalmazott) majd (4 percig, 40°C-on 200 μ g *L*-el (disznó pankreáz 46 egység/mg) hidrolizáltuk. Miután 200 μ l *EtOH*-al és 6 N HCl-el leállítottuk a reakciót, a keletkezett hidrolizátumot dietil-éterrel kivontuk, majd *FAB-MS* segítségével monoglicerid (*Mg*) analízist végeztünk, hogy meghatározzuk az *Sn*-2-es pozícióban levő *Fa*-t, ugyanis a *L* csak az *Sn*-1 és/vagy *Sn*-3-as pozícióban levő *Fa*-t képes hidrolizálni.

VII/2/8. A citoplazmatikus *LD*-k non-destruktív izolálása további vizsgálatok céljából

A *LD*-kben felhalmozott majd dinamikusan változó *Tg*-k meghatározása után a következő célunk az volt a citoszólban található, majd *LD*-khez kapcsolódó –feltehetően hormon szenzitív– *L*-eket tanulmányozhassuk. Ezeknek az ún. *LD*-khez kapcsolódó fehérjéknek (*LD Associated Protein (LDAP)*) szerepét és működését ismerjük a gerincesekben (pl. zsírszövet; Egan és mtsai., 1992) kevésbé a rovarokban is (pl. zsírtest; Ryan és van der Horst, 2000), de a *PG*-ben ill. a feromontermeléssel kapcsolatban teljesen új volt felvetésünk és semmilyen irodalmi előzmény nem állt rendelkezésre. A hipotézisünk szerint ugyanis a *LDAP*-k között keresendők azok, melyek specifikusan, –igaz közvetve, a *L*-ek dokkolása és aktiválása révén– de felelősek azért, hogy a *LD*-k *Tg* készletéből a „raktározott” feromon előanyagot

felszabadítsák és így szabad *Fa*-ként rendelkezésre álljanak a végső redukciós lépéshez, hogy a selyem-lepkében ismert *bombykol* szintézis befejeződhessen.

A fehérjék izolálásához és vizsgálatához ismét egy sajátos új módszert kellett kifejleszteni, mely biztosítja, hogy a végső vizsgálatokhoz megfelelő minta álljon rendelkezésre. A megoldásunk alapjait orvos-biokémiai előzmények biztosították (Sato és mtsai., 2002), melyet továbbfejlesztettünk és *PG* szövet kezelésére alkalmassá tettünk. A kidolgozott módszer röviden az alábbiakban foglalható össze:

A szövet feldolgozásához és kivonáshoz ismét két napos szűz nőtények *PG*-jét használtuk fel, ugyanis ekkor található a legtöbb és legnagyobb *LD* a sejtjeikben (ld. **Eredmények**). A *PG*-ket 35-40 egységekben preparáltuk ki a szokásos módon lepke *Ringer*ben majd *Eppendorf* csövekbe tettük és 500 µl Trisz-szukróz puffert (10 mM Trisz; 250 mM szukróz és proteáz inhibitorok; pH=7,5) adtunk hozzá. Ezt követően egy kézi, műanyag homogenizálóval homogenizáltuk a szövet darabokat, majd röviden centrifugáltuk. Az üledéket ismét homogenizáltuk és a felülúszókat összegyűjtöttük. A tökéletesebb kivonás érdekében egy harmadik immáron üveges-teflon homogenizálást (további 500 µl pufferben) is elvégeztünk biztosítva, hogy lehetőleg valamennyi *LD*-t viszonylag kíméletesen kivonjunk. Cukor gradiens ultracentrifugáláshoz az összegyűjtött mintát további 2ml Trisz-Na oldattal (10 mM Trisz 150 mM NaCl és proteáz inhibitorok; pH=7.5,). A csöveket kilendülő rotorba (*SW 60Ti*) helyeztük, majd ultracentrifugáltuk egy *Beckman L70K* ultracentrifugában (60 percig, 50,000 rpm, 4°C-on). Végül egy ún. „zsír-réteg” (*fat cake*) keletkezett. Ezt egyébként *Nílus*-vörös festéssel is ellenőriztük.

A zsír-réteg hatékony eltávolítása érdekében a csövet lefagyasztottuk és ezt követően leszeleteltük és használatig eltettük a kivonatot. Az *SDS-PAGE* előtt (Laemmli, 1970) a szukrózt eltávolítottuk *Millipore YM-3* filter egység segítségével. A mintát hagyományos *SDS-PAGE*-nak (14%-os gél) vetettük alá. Ezt követően *Coomassie* kézzel (*R-250*) és ezüsfestéssel is festettük a géleket. Hellman és mtsai. (1995) módszere nyomán a csíkokat kivágtuk, enzimatikusan emésztettük a proteineket, majd *RP-HPLC*-n frakcionáltuk azokat, melyeket végül rutin *MS* és peptid szekvenálás követett.

VII/2/9. Az *Lf*-ek és *LTP*-k részleges elválasztása és tisztítása az általuk szállított zsírszerű anyagokkal összefüggésben

A *LD*-k dinamikus változásával kapcsolatban egy további nyitott kérdés az volt, hogy vajon, hogyan és mi módon, ill. milyen zsírszerű anyagok jutnak be a *PG*-kbe (vérnyirokból) és

azok hogyan építik fel az általunk már ismertté vált *Tg*-ket. A rovarokban a *High-Density Lf*-ek (*HDLf*) és a *Low-Density Lf*-ek (*LDLf*) a legfontosabbak, valamint a sejthártyán a *Dg*-k átjuttatásában a lipid-transzfer részecnek (*Lipid Transfer Particle; LTP*) van nagy szerepük (Shapiro és mtsai., 1988; Ryan és van der Horst, 2000). Célul tűztük ki, hogy a vérnyirokban található *Lf*-eket ill. a *Dg*-k átadásában szerepet játszó *LTP*-ket kivonjuk és analizáljuk a hozzájuk kapcsolódó lipidek kémiai szerkezetét. Így remélhettük, hogy kiegészíthetjük ismereteinket az *LD*-k dinamikus változásait illetően nemcsak a mirigysejtben, hanem építő-elemeinek eredetét tekintve is.

Kísérleteinkhez ebben az esetben vérnyirok mintákat gyűjtöttünk és dolgoztunk fel a kelés előtt három ill. egy nappal, valamint frissen kikelt nőtényekből és két napos nőtényekből, továbbá dekapitált nőtényekből is. Egy-egy mintához 20-20 báb vagy nőtény egybegyűjtött vérnyirokját használtuk fel. A vérnyirkot egy jeges szerin proteázt tartalmazó *PBS* (pH=6,5) pufferbe gyűjtöttük (néhány kristály fenil-thioureával).

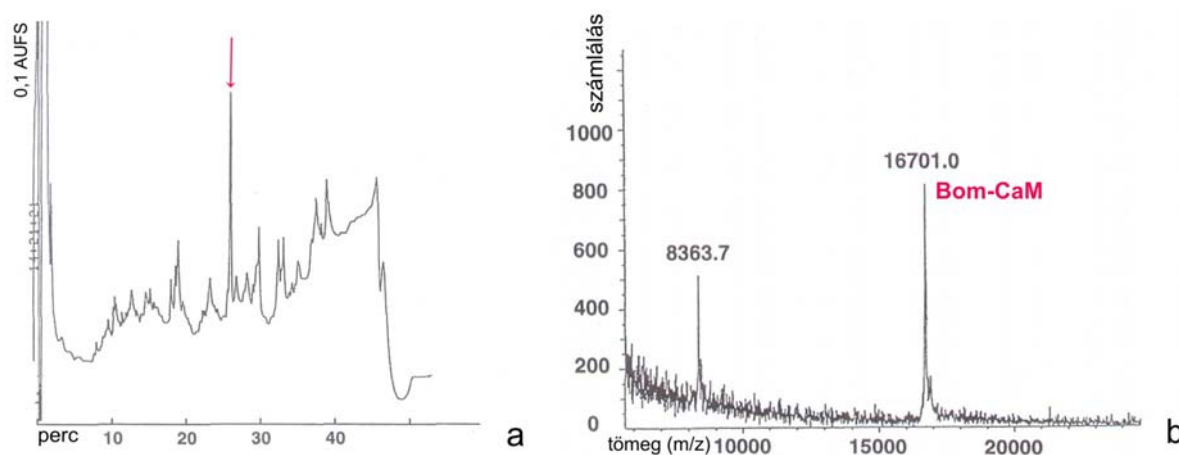
A mintavételezést követően centrifugálás és két lépcsős *KBr* gradiens ultracentrifugálás következett elsősorban Tsuchida és mtsai. (1997, 1998) nyomán csekély módosításokkal. Munkánkhoz *Beckman Ti 70* rotort használtunk a *Beckman Optima L70K* ultracentrifugához (4 óra, 4°C, 50,000 rpm). Az első ultracentrifugálást követően a sárga csíkokat azonosítottunk: a bábok esetében a felsők az *Lf*-ek míg az *LTP*-k lentebb láthatók. Az imágókban az *Lf*-ek kettéválnak, azaz legfelül a *LDLf*, lentebb a *HDLf* látható, míg alul található az *LTP* (bár igen gyengén látszik a karotinoidok hiányában). A *Hamilton* fecskendővel óvatosan eltávolított rétegeket ismét centrifugáljuk (16 óra, 4°C, 50,000 rpm). A keletkezett csíkokat korábbi irodalmak alapján azonosítottuk (Tsuchida és mtsai., 1997, 1998).

Az ultracentrifugálást követően még további sávokra választódtak szét a proteinek. Ezt követően minden frakcióból 500 µl-nyi mintát távolítottunk el (2-3 ekvivalens) melyet *Millipore YM-30* filter segítségével sóalanítottunk. Ekkor ellenőrzésként hagyományos *SDS-PAGE*-t (14%) is végeztünk és az eredményeket összevetettük Tsuchida és mtsai. közleményeivel (1997, 1998). Végül a koncentrátumot 500 µl-re kiegészítettük, kémcsőbe átpipettáztuk, majd végül 2,5 ml *Folchs* reagenst (kloroform:*MeOH*; 2:1) adtunk hozzá, majd kiráztuk a zsírokat. A kettévált rendszerben alul voltak a zsírszerű anyagok, amit *Pasteur* pipettával kiszívtunk. A kb. 2,5 ml-nyi kivonatot N_2 áram alatt beszárítottuk. Végül a mintákat 500 µl *n*-hexánban felvettük és a korábbi VII/2/7. pontban részletesen leírtak szerint szétválasztottuk (*HPLC*) és azonosítottuk (*FAB-MS*, *MS/MS*) a *Dg*-ket, pontosabban a *Fa*-kat.

VII/3. Eredmények

VII/3/1. A *Bom*-*CaM* izolációja, meghatározása és jellemzése

a) A *Bom*-*CaM* fehérjét a *PG* kivonat citoszolikus frakciójából tisztítottuk több lépcsőn keresztül. Először ion-cserélő oszlopon, majd *RP*-*HPLC*-vel végeztük az elválasztást és mintegy **200 pmol-nyi anyagmennyiségű csúcsot izoláltunk 25,9 percnél** (12. a. ábra). *MALDI*-*ToF* *MS* segítségével pedig megállapítottuk, hogy a *Bom*-*CaM* mért tömege 16,701 kD (12. b. ábra), mely eredmény jó egyezést mutatott más *CaM* molekulákkal is.



12. ábra: A *Bom*-*CaM* végső *RP*-*HPLC* tisztítás kromatogramja és *MALDI*-*ToF* *MS* tömege.

a: *UV*-detekció 225 nm. *Senshu-Pak VP-318* oszlopon (A=10% *AcNi* B=50% *AcNi* 20 mM ammónium acetát pH=7,0; 0-100%B 40 perc alatt; 1ml/perc). A piros nyíl a *CaM* frakciót jelöli. b: A *Bom*-*CaM* mért tömege. A számított $(M+H)^+$ 16711,8 volt.

b) A *Bom*-*CaM* aminosav szekvencia meghatározáshoz kimotropszinnel, valamint endoproteináz segítségével (*Asp*-N) több egységre emésztettük a nagy molekulát, ill. *BrCN*-al ún. kémiai bontást is végeztünk. A termékeket külön-külön *RP*-*HPLC*-val szétválasztottuk. Kontrollként ugyanezt a folyamatot végigvittük marha-agy *CaM* proteinnel is.

Az analízis során sikerült megállapítani, hogy az N-terminális aminosav ténylegesen egy blokkolt N-acetil-Ala, mely szintén hasonlít más ismert *CaM* molekulákhoz, valamint azt, hogy a C-terminális vég nem amidált. Leszögeztük, hogy **egy 148 aminosavból álló molekuláról van szó, aminek a tényleges (számított) molekula tömege: 16,7118 kD**. A részegységek tömegeinek, valamint azok szekvencia analíziseit követően a rendelkezésre álló mozaikok segítségével a következő aminosav sorrendet állapítottuk meg:

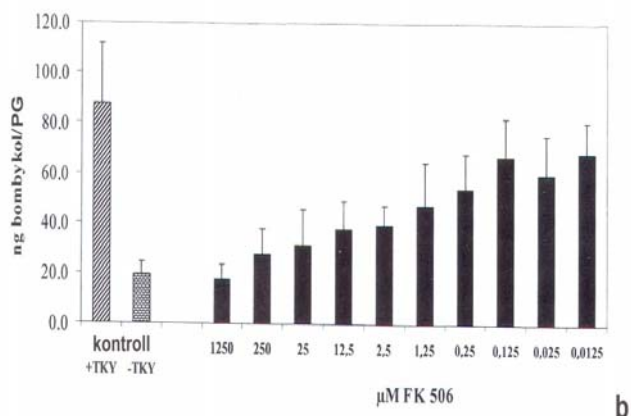
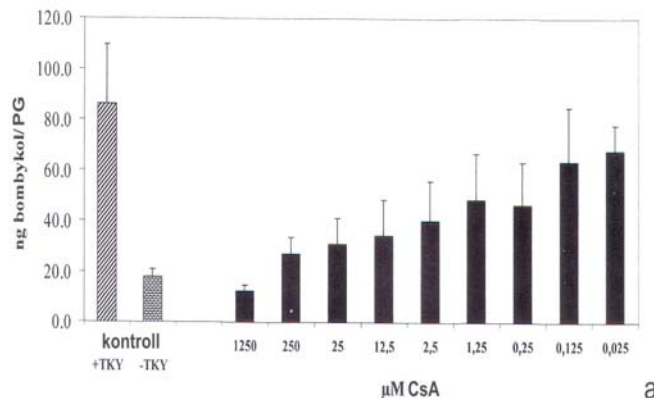
***Bom*-*CaM*: Ac-ADQLTEEQIAEFKEAFSLFDKGDDTITTKELGTVMRSLGQNPTEA-
ELQDMINEVDADGNGTIDFPEFLTMMARKMKDTDSEEEIREAFRVFDKDGNG-
FISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEMIREADIDGDGQVNYEEFVTMMTSK-OH**

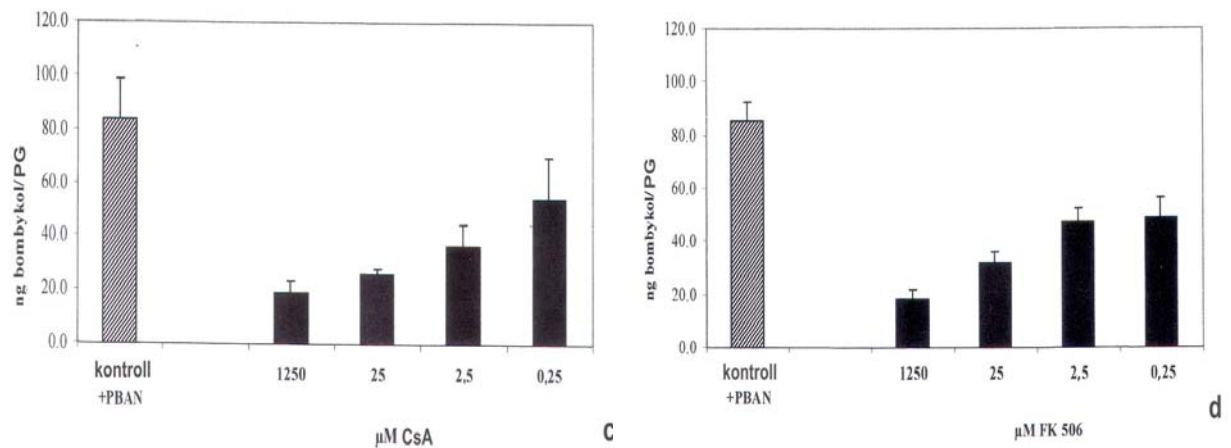
c) Végezetül, az ismertté vált eredmények ill. a szekvencia alapján elvégeztük a *Bom-CaM* protein szintézisét és az így nyert molekulát ellenőrzésképpen az elválasztás során használt *RP-HPLC Senshu-Pak VP-318* oszlopon megfuttattuk, ill. biológiai aktivitás tesztet is elvégeztük vele. Az ellenőrzések igazolták valamennyi eredményünket.

VII/3/2. A *CaN* szerepének bizonyítása a *PBAN* jelátadási folyamatában

a) A *Bom-CaM* izolálását és azonosítását követően az *in vitro* farmakológiai kísérleteink, valamint a sejtmentes mikroszóma frakcióval végzett munkák a *CaN* szerepének egyértelmű bizonyítását tűzték ki célul a *PBAN* jelátadási folyamatában. A munka során az alábbi számos részeredményt nyertünk, mely felvetett hipotézisünket támasztották alá.

Mind a *CsA*, mind pedig az *FK 506* –melyek specifikus inhibitorai a *CaN*-nek– **határozott dózis-hatás gátlást (telítődési görbe) mutatott az *in vitro* izolált *PG* vizsgálatokban**, amikor *TKYFSPRLamid* (13. a. és c. ábrák), vagy *Bom-PBAN-I* (13. b és d. ábrák) neuropeptiddel együtt inkubáltuk. A legmagasabb koncentrációban (1250 μM) gyakorlatilag 100%-os gátlást sikerült elérni, továbbá az ED_{50} mindkét farmakokémikáliánál azonos (1,25 μM).

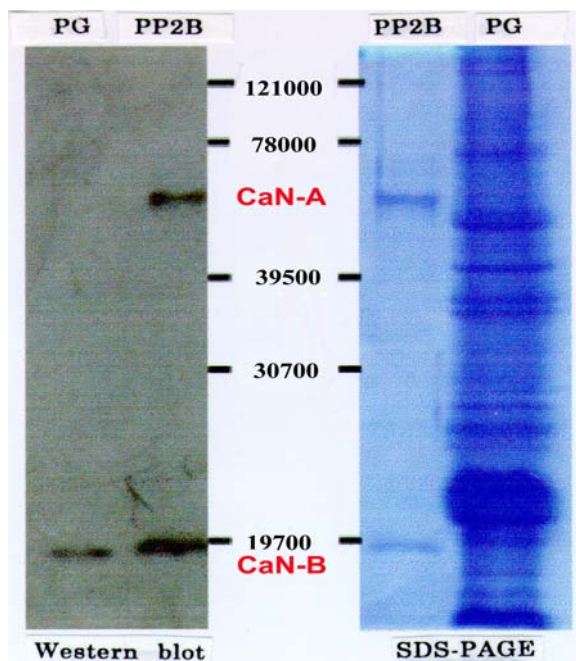




13. ábra: A *CsA* (a. és c. ábrák), valamint az *FK 506* (b. és d. ábrák) *in vitro* feromonszintézis gátló hatása *TKY(FSPRLamid)* szintetikus peptid vagy *Bom-PBAN* jelenlétében.

A *PG*-ket 40 μ l *Grace* médiumban inkubáltuk a jelöléseknek megfelelő inhibitor kombinációban és koncentrációban. A +*TKY* vagy +*PBAN* (sávos oszlop) a pozitív kontrollt jelöli (5-5 pmol) amelyhez csak *EtOH*: *DMSO*-t (a. c. kezelések) vagy csak *DMSO*-t adtunk (b. d. kezelések). A – kontroll nem tartalmazott peptidet. A számított átlagok legalább 9 független minta eredményéből származnak, a vékony vonalak a \pm SD-t jelölik.

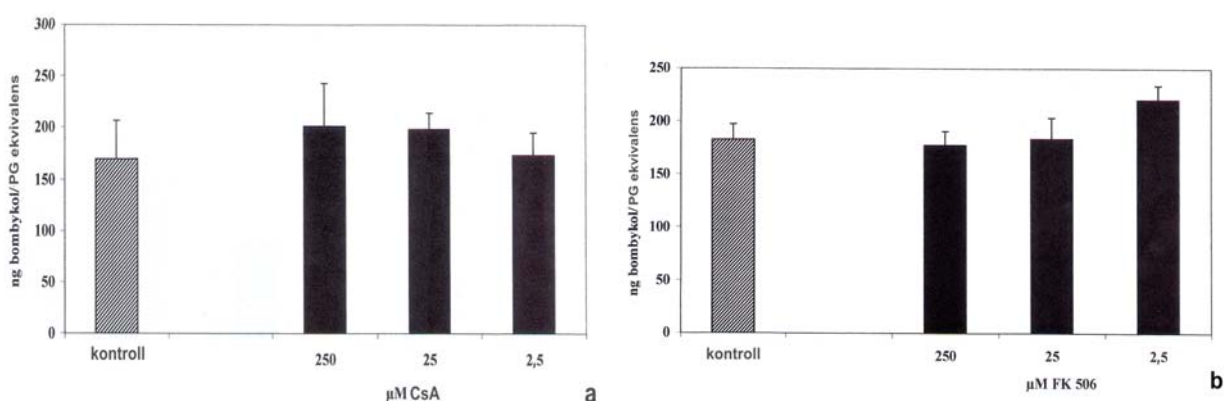
b) A *CaN* részvételét a jelátadási rendszerben még további vizsgálatokkal is megerősítettük, nevezetesen *SDS-PAGE* hagyományos gélelektroforézis rendszer alkalmazásával standard marha-agy *CaN* (*PP2B*)-val párhuzamosan futtatva, valamint *Western blot* segítségével. Amint az a 14. ábrán látható a standard (autentikus) *CaN A* és *B* alegysége jól elkülönül (61 és 19,7 kD), a *PG*-ből készített mintából is tisztán azonosítható a poliklonális nyúl antitesttel a 19,7 kD tömegű egység. Az *SDS-PAGE* eljárással azonban mindkét alegység (*A* és *B*) tisztán látható, ami egyszerű *SDS* előkezeléssel került kivonásra a *PG*-ből.



14. ábra: *Western blot* (bal oldalt), valamint *SDS-PAGE* analízise (jobb oldalt) a *PG CaN* ill. autentikus marha-agy *CaN* (*PP2B*) kivonatnak poliklonális nyúl antitesttel.

A marha-agy *CaN* ellen termeltetett antitestek keresztreaktivitást mutatnak a 19,7 kD tömegű csíkkal a *PG*-ben, melyek egyébként együtt vándorolnak a *PG*-ből származó *CaN*-el az *SDS-PAGE* során.

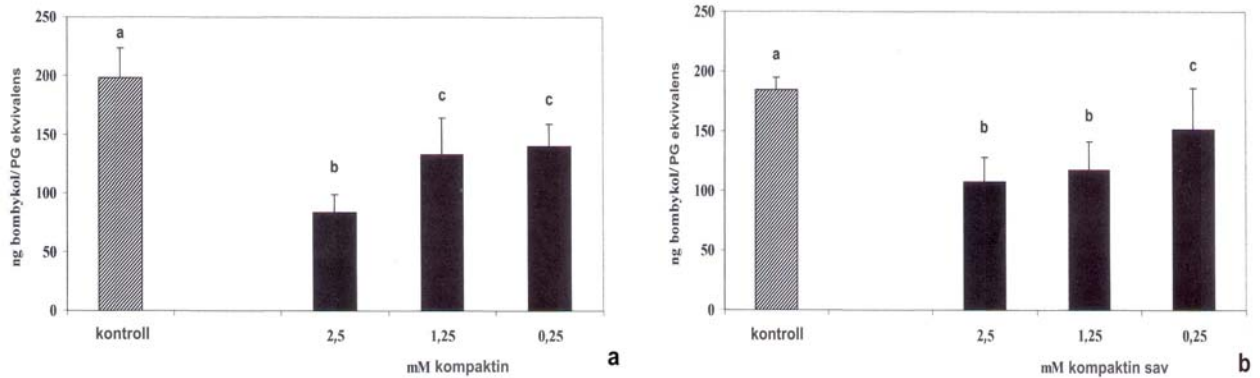
c) Figyelemreméltó metodikai részeredmény –melyek rendkívül jól szolgálják a *bombykol* termelés folyamatának vizsgálatát–, hogy korábbi módszereket továbbfejlesztve és befejezve, **sikerült teljesen kidolgozni egy működőképes, sejtmentes ún. *CHAPS Sup. mikroszóma* teszt rendszert**, melynek leggyakrabban használt standardizált körülményeit a VII/2/3. alfejezet b.) pontjában ismertettem részletesen (Fónagy és mtsai., 1999). Jelen vizsgálatainkban, **a kontrollhoz képest ugyanannyi *bombykolt* termel egy-egy teszt összeállítás (170 ± 15 ng *bombykol*/PG ekvivalens)**, mind *CsA*, mind pedig *FK 506* jelenlétében (15. a,b. ábrák) mely bizonyítja, hogy az eljárás során a citoszólikus frakcióba elválasztásra kerülnek a *PBAN* jelátadási mechanizmusban egyébként nélkülözhetetlen elemek.



15. ábra: A PG ekvivalensek *bombykol* termelőképesége *CHAPS Sup.* mikroszóma frakcióban *CsA* (a. ábra) ill. *FK 506* (b. ábra) jelenlétében.

Az elegy (40 μl végtérfogat) Trisz-HCl (pH=7,5), 10mM *NADPH*, 2,5mM *ATP* és 0,5mM (*Ac*)*CoA* tartalmú és két PG ekvivalensnyi *CHAPS Sup.*-ot adunk hozzá és a tesztelendő farmakokémikáliát, míg a kontrollhoz csak *EtOH:DMSO*-t (a.) vagy csak *DMSO*-t (b.). Az eredmények átlagai három független mérésen alapulnak melyeket vagy duplikátban vagy triplikátban végeztünk, a vékony vonalak az \pm SD-t jelölik. Az eredmények nem különböznek szignifikánsan ($P < 0,05$).

d) A fenti mikroszóma *CHAPS Sup.* rendszert használtuk egy másik farmakológiai vizsgálati sorozathoz, amely az *ACR* enzim kulcsfontosságú szerepét volt hivatott igazolni más körülmények között. Feltételeztük ugyanis, hogyha a *kompaktin*/-sav képes volt *in vitro* gátolni a *bombykol* termelést (a végső redukciós lépés gátlásával) valamilyen *PT/PBAN* jelenlétében, akkor minden bizonnyal, a mikroszóma *CHAPS Sup.* rendszerben is kifejti gátló hatását annak ellenére, hogy „energiával” (*NADPH*, *ATP*) és „szubsztráttal” (*AcCoA*) ellátjuk. Mint ahogy ez a 16. a. és b. ábrákon látszik, **mind a *kompaktin*, mind pedig a *kompaktin*-sav szignifikánsan képes volt gátolni a *bombykol* termelését**. (Megjegyzés: Ez a gátló hatás sokkal szembetűnőbb akkor, amikor a termelőési folyamatot 2-2 órás intervallumokban követjük nyomon, ugyanis a 16. ábrán már egy kumulatív termelés eredménye látható 10-12 órával az inkubáció megkezdése után. A rövidebb periódusokban mért résztermelést nem ábrázoltam).



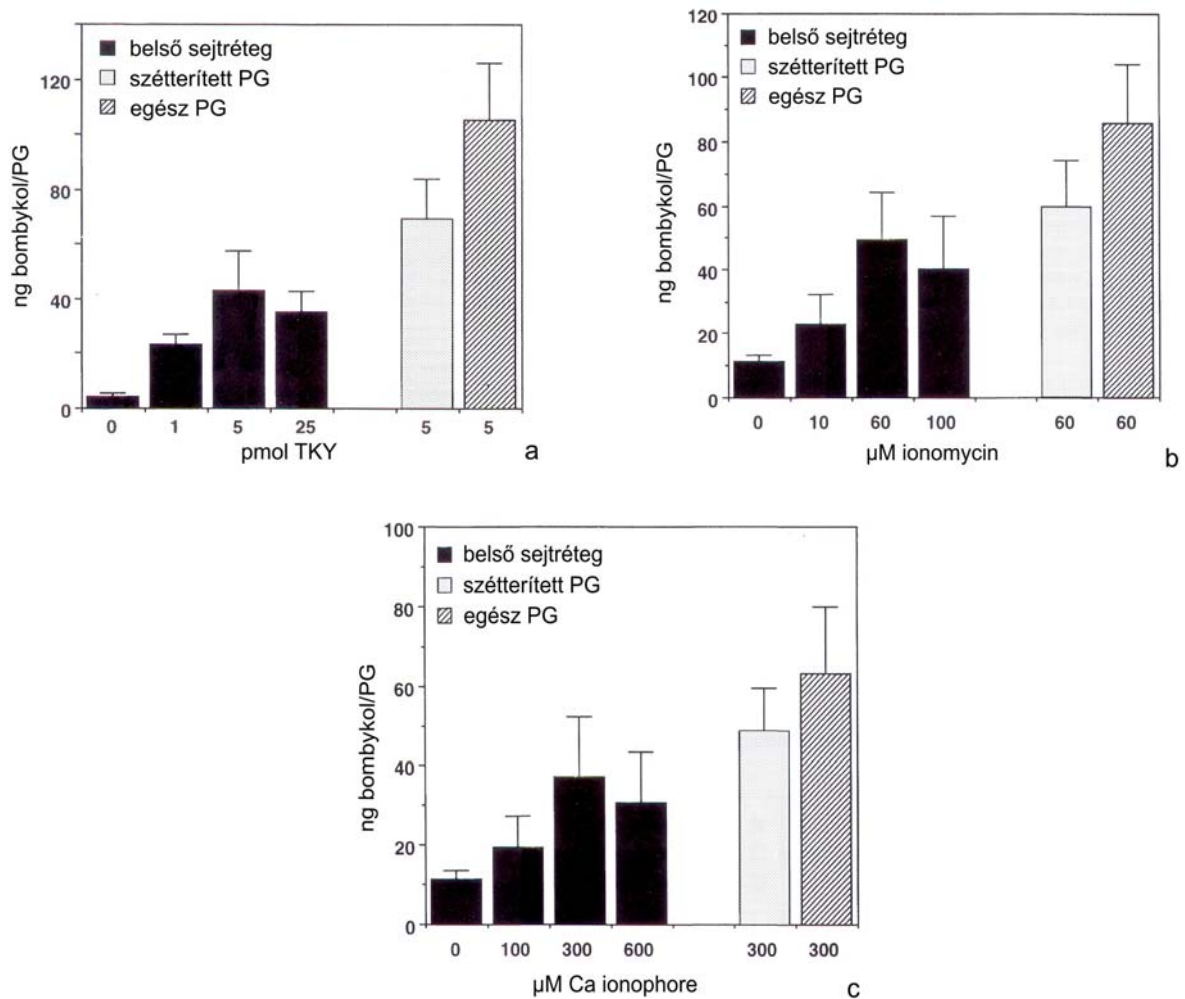
16. ábra: A *PG* ekvivalensek *bombykol* termelőképesége *CHAPS Sup.* mikroszóma frakcióban *kompaktin* (a. ábra) ill. *kompaktin-sav* (b. ábra) jelenlétében. (A részleteket lsd. a 15. ábránál). A kontrollokhoz *DMSO*-t (a.) ill. *DMSO+NaOH*-t (b.) adtunk. Az eredmények átlagai három független mérésen alapulnak melyeket vagy duplikátban vagy triplikátban végeztünk, a vékony vonalak az \pm SD-t jelölik. Az eredmények szignifikánsan eltérnek ott ahol más betűjelet alkalmaztunk ($P < 0,05$).

VII/3/3. A *bombykol* termelő *PG* sejtek azonosítása, izolálása és kultúrában tartása

a) A rutinná vált az *in vivo*, *in vitro* vizsgálatok, valamint sejtmentes kivonatok használata a *bombykol* termelésének ill. a *PBAN* jelátadási rendszer folyamatának tanulmányozására ezért következő célunk az volt, hogy a tényleges epidermális eredetű mirigy sejteket elkülönítsük, sejt kultúrában tartsuk különböző vizsgálatok céljából.

A *PG* ún. belső (alsó, epidermális mirigysejtek) rétegét, valamint a külső (vagy felső, kutikula) rétegét egy sikeres emésztési folyamattal és eljárással rutinszerűen tudtuk szétválasztani, melynek részletes leírását az VII/2/4. a. alfejezet adja meg (Fónagy és mtsai., 2000). Számos emésztő enzim került kipróbálásra (pl. kollagenáz, diszpáz, pankreatin stb.), továbbá jónéhány egyéb lepke *in vitro* kísérletekhez javasolt *Ringer* rendszer is (valamint a *Grace* médium), de számunkra továbbra is a Matsumoto és mtsai. (1995) által használt bizonyult a legjobbnak. A papainos emésztés a rétegek közötti emésztésre nyújt megoldást, de nem emészt az azonos sejt-sejt közötti kapcsolatot, ami viszont fontos előny lehet a sejtek integritásának és életben maradásának biztosításában.

b) Farmakológiai vizsgálatokat végeztünk a belső sejtréteggel, valamint kontrollként a külső módosult kutikulával, ill. a korábban is rendszeresen használt *in vitro PG* egész miriggyel és a szétterített miriggyel. **A dózis-hatás vizsgálatok eredményei a *TKYFSPRLamid* szintetikus peptiddel, valamint az *ionomycin* és *Ca ionophore* (divalens kationok beáramlást serkentők) ágensekkel a várakozásnak megfelelően, a korábban *in vitro* kísérleteknél tapasztalt leghatékonyabb dózisokkal egyezett meg** (17. a-c. ábrák). A kutikula réteg semmilyen termelést nem mutatott.



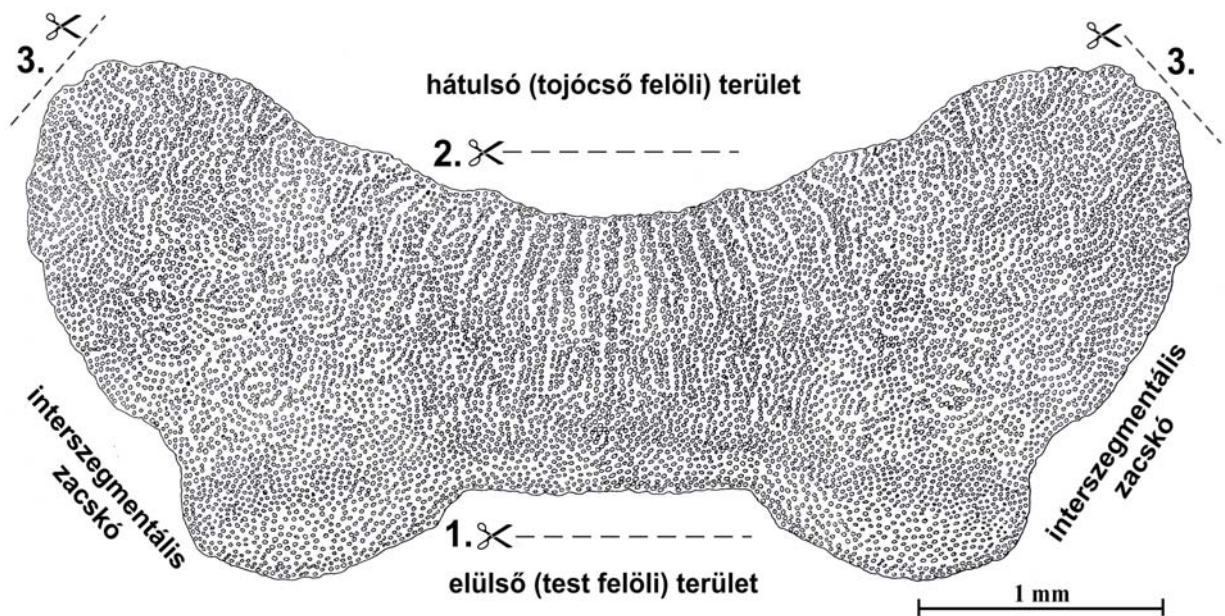
17. ábra: A *TKY*(*FSPRLamid*) szintetikus peptid (a. ábra), valamint *ionomycin* (b. ábra) és *Ca ionophore* (c. ábra) kezelések hatásai a különböző módon preparált PG-re.

Az ún. „belső sejtréteget” papainos emésztéssel nyertük. Minden esetben 40 μl *Grace* médiumot használtunk, amelybe a megadott koncentrációban volt jelen a vizsgálandó ágens. A számtott átlagok legalább 9 független minta eredményéből származnak, a vékony vonalak az \pm SD-t jelölik.

c) Célul tűztük ki azt is, hogy a leemésztett laza szerkezetű sejtréteget minél tovább életben tartsuk steril körülmények között. A hosszabb tartáshoz a *Grace* médium bizonyult legjobbnak (28°C). A leemésztett feromontermelő mirigysejtekből a már korábban (VII/2/3. c.) leírtaknak megfelelően *CHAPS Sup.*-ot is készítettünk. Megvizsgáltuk a mikroszóma frakciók *bombykol* termelő képességét és megállapítottuk, hogy mind a leemésztett mind pedig az öt napig kultúrában tartott sejtek megtartják *bombykol* termelő képességüket, igaz csökkentett mértékben (az előbbi esetben kb. 30%-os, míg utóbbi 50%-os csökkenést tapasztaltunk).

VII/3/4. A *bombykol* termelő *PG* sejtek fluoreszcensz mikroszkópos vizsgálata, valamint jellegzetes sejttani dinamizmusa és a folyamat *PBAN* általi befolyásoltsága

a) A mikroszkópos vizsgálatok esetében is szakítottunk a hagyományokkal, mert nem csak hagyományos fénymikroszkópos és elektronmikroszkópos megfigyeléseket végeztünk (ld. lentebb), hanem legelőször is azt a tényt, hogy **változó mennyiségű és nagyságú LD-kre lettünk figyelmesek**, mindenképpen alaposabban és célzott eszközökkel kívántuk tanulmányozni. Ezért bizonyult a *Nilus*-vörös festés alkalmazása egy rendkívül hatékony, egyben viszonylag könnyebben kivitelezhető módszernek. Ehhez kapcsolódóan a *Hoechts* sejtmagfestés, valamint ezen két festés egyidejű alkalmazása egy **speciális rovarszövet vizsgálatához újdonságnak számított**. A festési módokat azonban még kiegészítettük az emésztési (szétválasztási) eljárással, így egyedülálló megfigyelésekhez, valamint impozáns képekhez jutottunk.



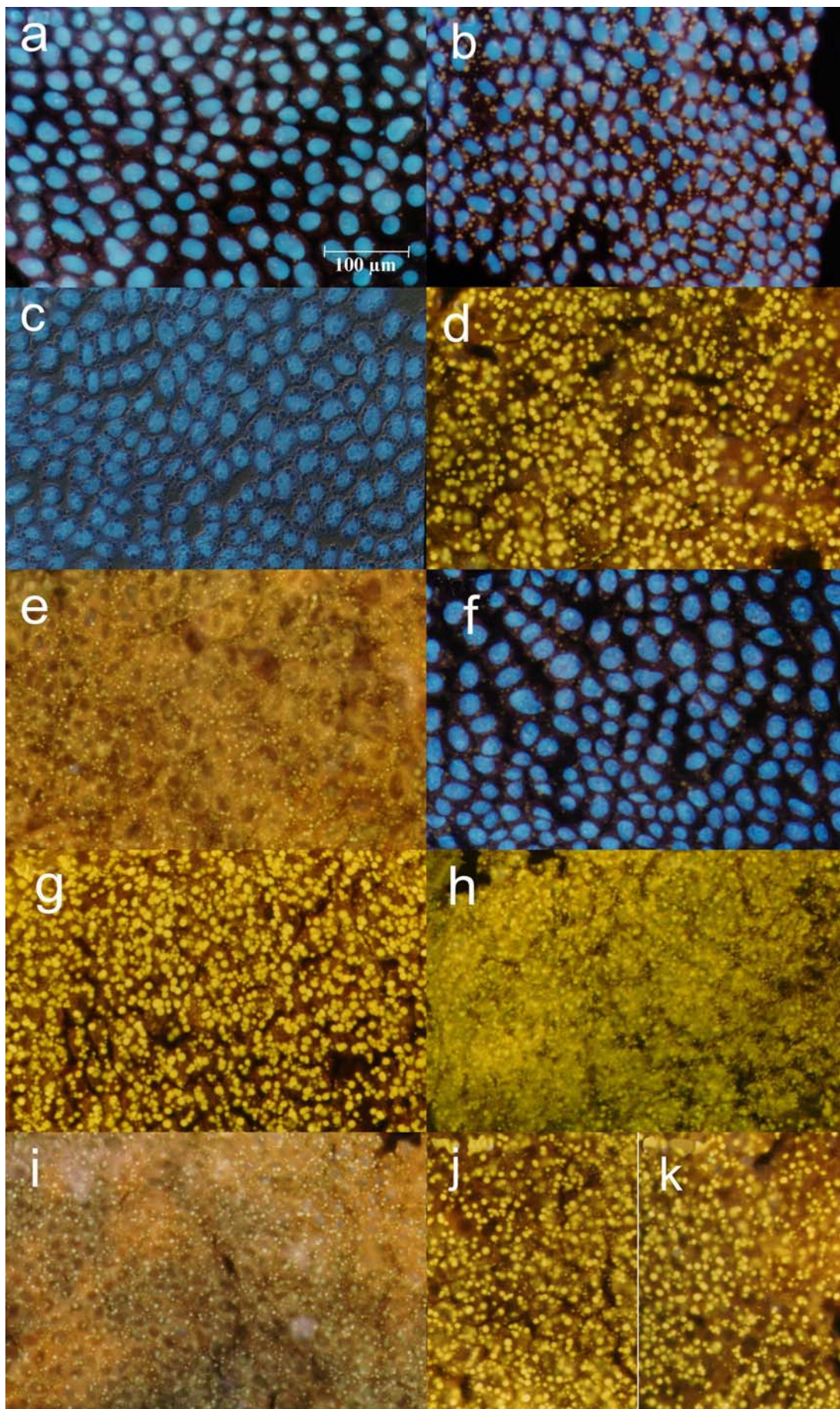
18. ábra: A megtisztított és szétterített egész *PG*.

A könnyebb orientációt segíti az a számozott vágási sorrend ahogy a *PG*- levágjuk a potrohvégénél, majd további 2 metszéssel átvágjuk és finoman szétterítjük. A rajz elsősorban *Hoechst 33342* sejtmag festés segítségével készült. Számított sejtsűrűség 15 ± 3 sejt/ $0,01 \text{ mm}^2$.

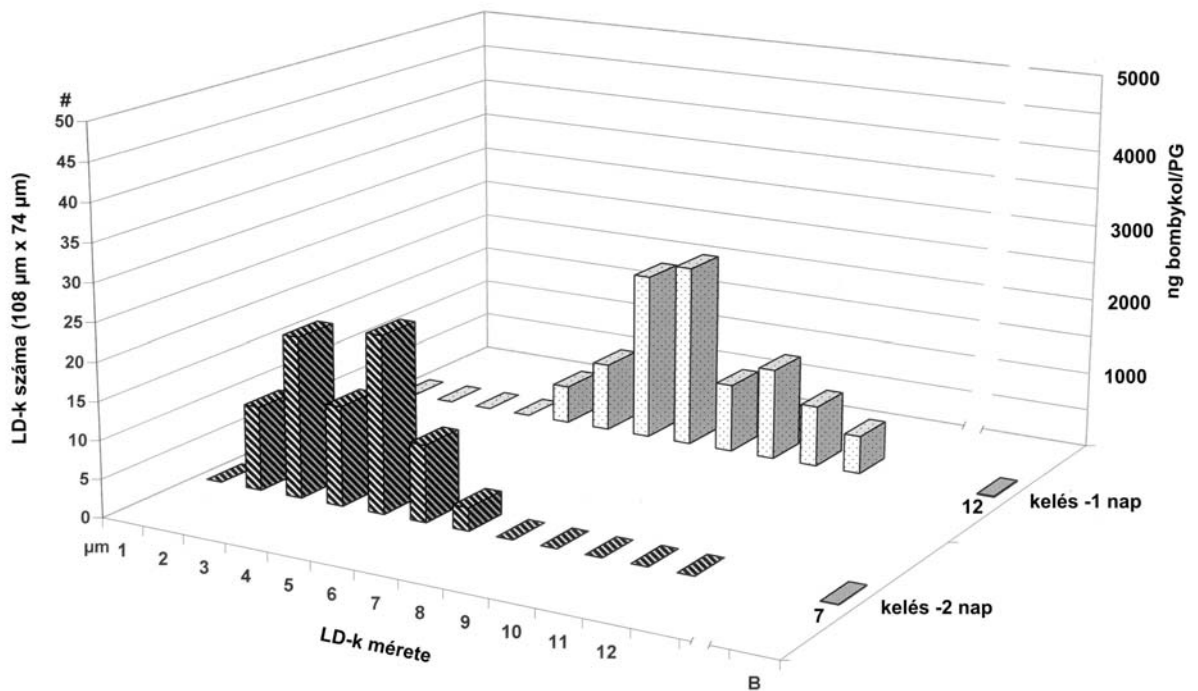
Az első fontos általános megfigyelések összegzését a 18. ábrán láthatjuk. A preparátumok segítségével azt is megállapítottuk, hogy **a sejtek átmérője 25-35 μm és 15 ± 3 sejt/ $0,01 \text{ mm}^2$ a sejtsűrűség és egy igen homogén, szorosan egymás mellett elhelyezkedő sejttállományról van szó. A nagy sejtmagot számos dinamikus változó *LD* veszi körül.** A sejtek életképességét (elsősorban az emésztési szétválasztás után) ellenőriztük *Calcein* (fluoreszcenz) vitális festéssel, ahol a sejtek 80-90%-a élő volt. Vizsgáltuk azt is *Acridine orange*-al, hogy a vizsgált periódusban, már nincsen sejtproliferáció, hanem a sejtek funkcionális dinamizmusa miatt változnak.

b) A *PBAN* szerepének tisztázására a *LD*-k változásában volt az egyik legfontosabb feladat. A színes táblán (19. ábra) számos kezelés és többféle korú *PG*-ből készült preparátum képe látható. A 19. a. képen két nappal kelés előtti állapot látszik, amikor az *LD*-k száma kevés és kicsinyek ($<5 \mu\text{m}$). Egy nappal a kelés előtt ez már változik (19. b. kép dupla festéssel) és (19. c. kép, csak *Hoechst 33342* festés), míg a kelés idejére (egybeesik a napi fényperiódus kezdetével) méretük és számuk nagy lesz ($4-10 \mu\text{m}$) (19. d. kép). A 19. e. képen –a fényperiódus középidejében (i.e. 1:6 korú)– az *LD*-k ismét kicsik lesznek és számuk is csökken, a sötétebb árnyak a sejtmagok. Az 19. f. képen egy azonos fázisban levő (2:6 korú), de egy nappal idősebb preparátum látható dupla festéssel. A 19. g. képen egy három napos dekapitált nőstény *PG*-je látható óriás méretű cseppekkel ($12-14 \mu\text{m}$), míg a következő képen (19. h.) háromszor *in vivo Bom-PBAN-I*-el kezelt dekapitált nőstény *PG* szövete látható sok apró *LD*-vel. A 19. j. és k. képeken egy egynapos pároztatott nőstény, ill. egy egynapos dekapitált nőstény *PG*-je látható, ahol a hasonlóság szembetűnő, mivel mindkét esetben már felfüggesztődött a *bombykol* termelődés.

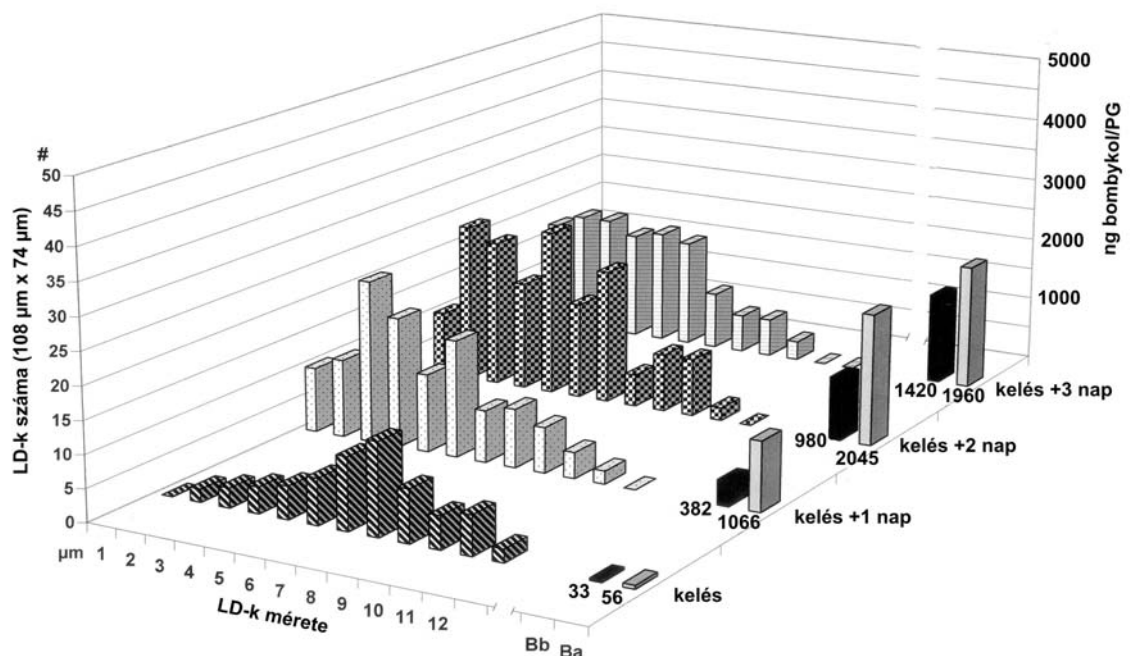
c) A *PG*-ben talált feltűnő mennyiségű, méretében változó *LD* arra sarkallt bennünket, hogy a folyamatot részleteiben is megvizsgáljuk. A hat napon keresztül (a kelést követően napi négy időpontban) folytatott vizsgálat eredményeit, valamint a kapcsolódó *bombykol* méréseket a 20-24. ábrákon foglalom össze. A könnyebb összehasonlítás végett egy ábrán (21-24. ábrák) a kelést követő napok azonos időpontjai láthatók (pl. 0:0, 1:0; azaz kelési nap 0. óra, első nap 0. óra stb.). Az ábrákról jól leolvasható, hogy **az *LD*-k mérete és száma legnagyobb a kelést követő első és második napon, mégpedig a fényperiódus elején, amit később nagyon magas *bombykol* termelés is követ.** A kelést követő harmadik napon már tompul majd a negyedik napra az említett dinamikus fluktuáció erősen lecseng, mely eredményeket már külön nem mutatok be. A megfigyeléseket és méréseket Fónagy és mtsai. (2001) részletesen leírták és közölték.



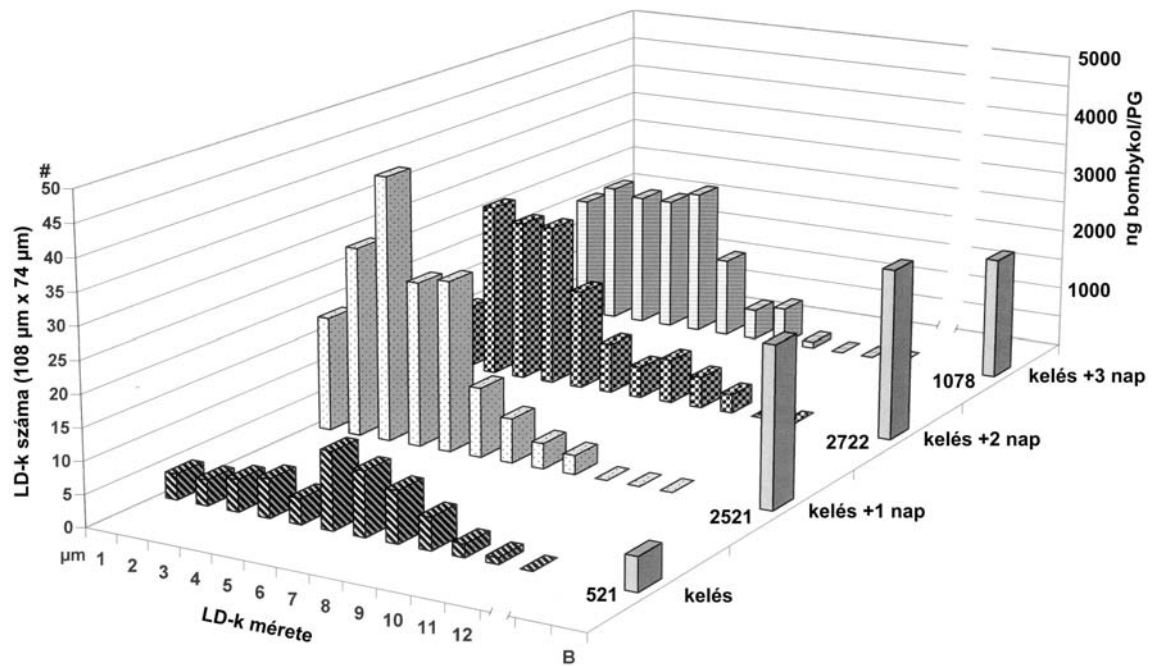
19. ábra: *PG* sejtek fluoreszcensz mikroszkópos képei. (Részleteket lsd. a VII/3/4. b) pont alatt).



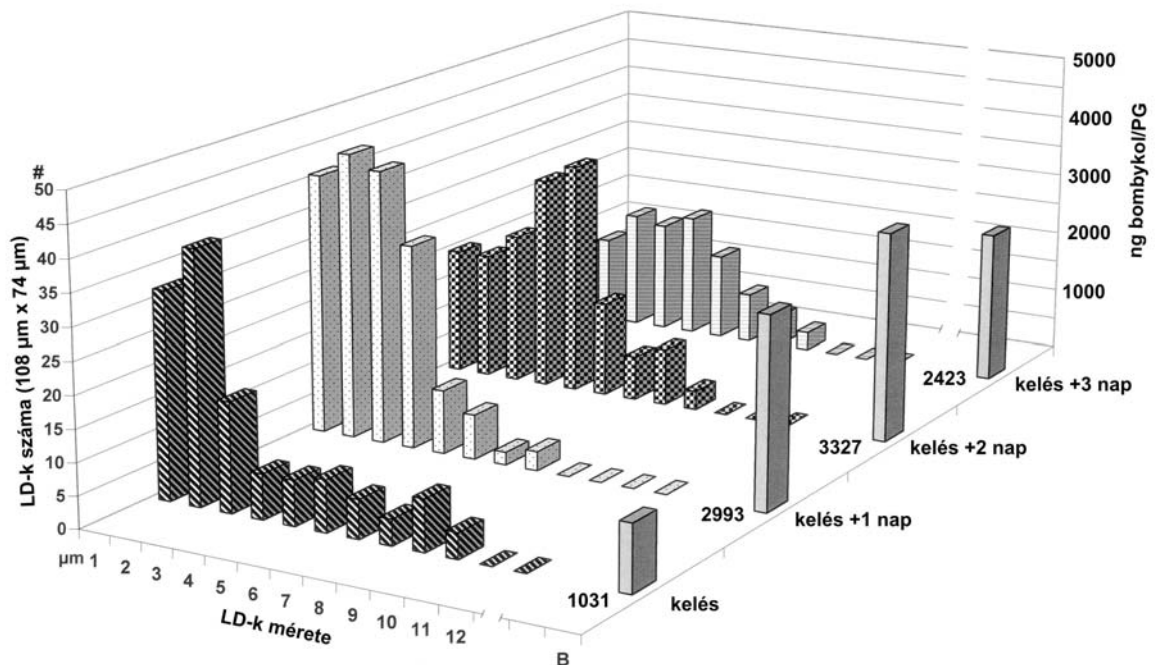
20. ábra: Az *LD*-k számának és méretének változása adott területen. (Részleteket lsd. a 24. ábránál). A diagramon a kelés előtt két nappal, valamint kelés előtti napon vett nőstény bábokból származó minták eredményei láthatók. Tájékoztatóképpen a *bombykol/PG* mennyisége az adott időben is látható



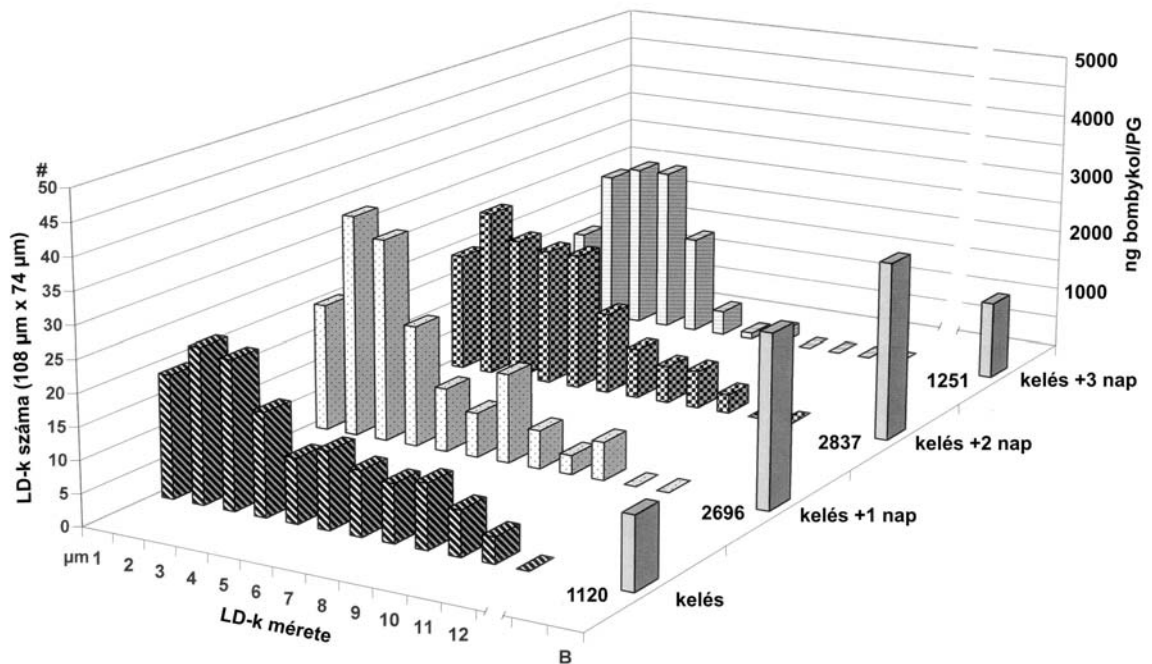
21. ábra: Az *LD*-k számának és méretének változása adott területen. (Részleteket lsd. a 24. ábránál). A diagramon a keléstől (azaz 0. nap 0. óra) további három napon keresztül vett mintákból (1. nap 0. óra stb.) származó eredmények láthatók. Tájékoztatóképpen a *bombykol/PG* mennyisége az adott időben látható (Bb sor: 30 perccel a fotofázis előtt; Ba: 60 perccel a fényperiódus kezdete után).



22. ábra: Az *LD-k* számának és méretének változása adott területen. (Részleteket lsd. a 24. ábránál). A diagramon a kelés napjától (azaz 0. nap 4. óra) további három napon keresztül vett mintákból (1. nap 4. óra stb.) származó eredmények láthatók. Tájékoztatóképpen a *bombykol/PG* mennyisége az adott időben látható.



23. ábra: Az *LD-k* számának és méretének változása adott területen (Részleteket lsd. a 24. ábránál). A diagramon a kelés napjától (azaz 0. nap 8. óra) további három napon keresztül vett mintákból (1. nap 8. óra stb.) származó eredmények láthatók. Tájékoztatóképpen a *bombykol/PG* mennyisége az adott időben látható.

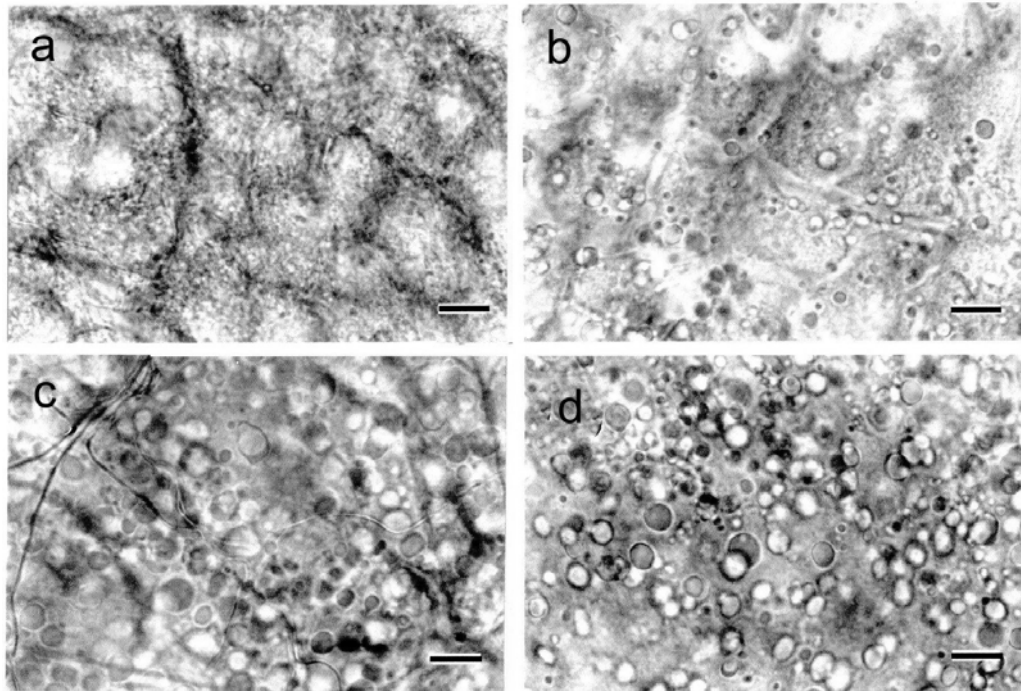


24. ábra: Az *LD*-k számának és méretének változása adott területen.

A diagramon a kelés napjától (azaz 0. nap 12. óra) további három napon keresztül vett mintákból (1. nap 12. óra stb.) származó eredmények láthatók. A vizsgált terület valamennyi ábrán (20-24) azonos ($108\ \mu\text{m} \times 74\ \mu\text{m}$). A számlálást 15-15 külön felvétel alapján történt, melyet átlag és szórás számítása követett. Az eredmények igen homogének voltak, a szórás mindig 15% alatti volt, ezért a jobb áttekinthetőség kedvéért a diagramokon külön jelölésre nem kerültek. Tájékoztatósképpen a *bombykol/PG* mennyisége az adott időben látható.

VII/3/5. A *bombykol* termelő PG sejtek ultrastruktúrális vizsgálata, jellegzetes dinamikus folyamatok feltérképezése és leírása

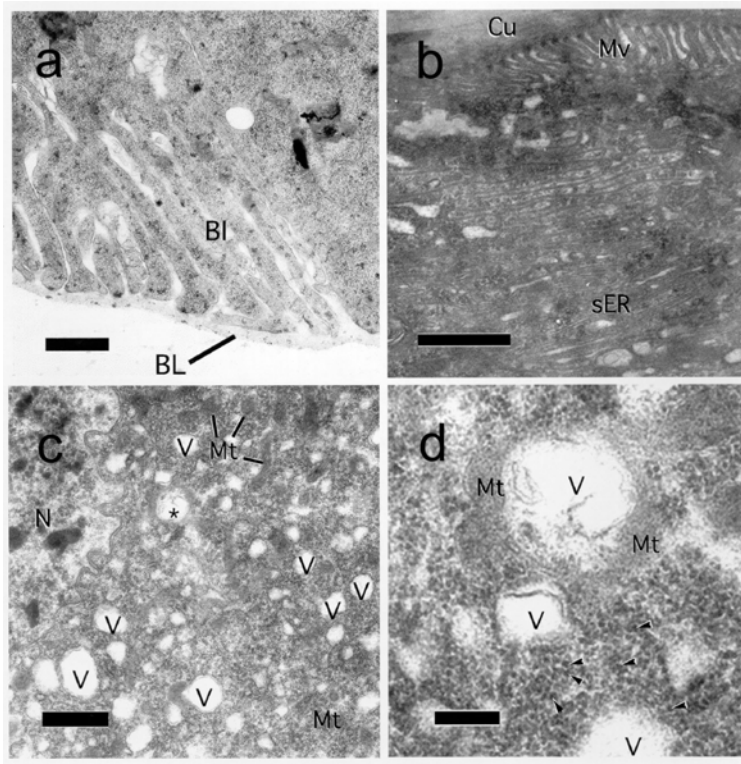
a) A hagyományos fénymikroszkópos vizsgálatok során vizsgálatainkat a kelést megelőző három nappal kezdtük és a kelést követő ideig folytattunk és a jellegzetes *LD* fejlődési folyamatot a 25. a-d. fényképeken követhetjük nyomon. **Három nappal a kelést megelőzően csupán a sejtek körvonalai látszódtak a módosult kutikula alatt, de *LD*-k egyáltalán nem.** A következő napon már kivehetők a csepp kezdemények, de nagyon kis átmérőjűek ($<5\ \mu\text{m}$), míg a kelést megelőző napon már jelentős mértékben nőtt méretük és számuk, ami a kelésig még fokozódott (átmérő: $4\text{-}10\ \mu\text{m}$). A sejthártya alig kivehető már ekkor az *LD*-k takarásának köszönhetően.



25. ábra: Az *LD*-k fejlődési folyamatának nyomonkövetése fénymikroszkóppal *PG* preparátumok segítségével.

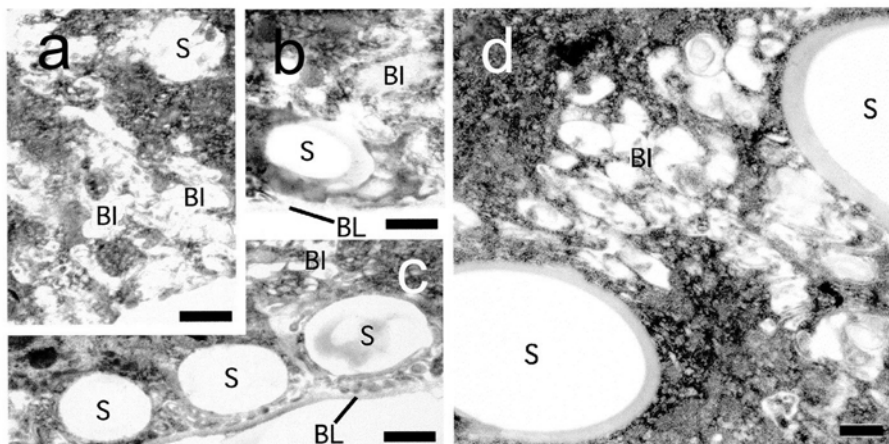
Az a. képen három nappal kelés előtt állapot látható a sejtek körvonalaiival. A b. képen két nappal a kelés előtti állapotban már kivehetők csepp kezdemények. A c. képen kelés előtt nap, míg a d. képen a kelést követő állapot látszik. A méret skála 10 μm .

b) A fény és fluoreszcens mikroszkópos megfigyelések után kézenfekvő volt, hogy a folyamatot alaposabban tanulmányozzuk elektronmikroszkóp segítségével. Már két nappal a kelést megelőzően a bazális lamina (*BL*) alatt kialakuló betűrődéseket (*BI*) lehet látni (26. a. ábra), míg az apikális oldalon jól kivehetők a mikrovillusok (*Mv*) (26. b. ábra). Igen sok apró vezikulum (*V*) látható ekkor a citoplazmában főleg az *Mt*-k környékén, vagy szinte velük fuzionáltan, továbbá bot alakú *Mt*-k lamellált ciszternákkal (26. c. ábra). Szabad riboszómák is jól láthatók ekkor és utána is folyamatosan (26. d. ábra). Jól kirajzolódnak továbbá az apikális oldalon hosszú ciszternákkal övezett *sER*-k, amik a következő napokban azonban már alig kivehetők (26. b. ábra).

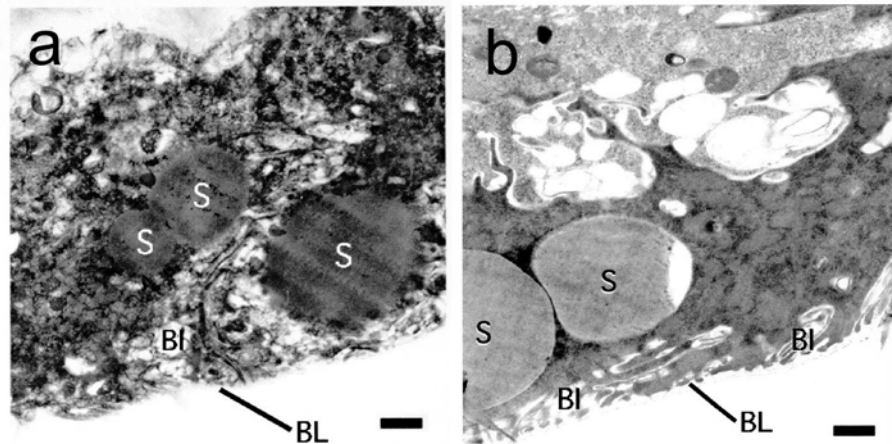


26. ábra: A *PG* sejtek bemutatása elektronmikroszkópos képek segítségével két nappal a kelés előtt. Az a. képen az alaphártyán (*BL*) betűrődések látszanak (*BI*). A b képen a kutikula (*Cu*) alatti mikrovilluszok (*Mv*) láthatók. A c. képen számos vezikula (*V*) rajzolódik ki, továbbá lamellált ciszternákkal mitokondriumok (*Mt*). A d. képen a nyílhegyek a szabad riboszómákat jelölik. A méret skálák 1 μm -t jelölnek, kivéve a d. képen ahol 0,25 μm -t.

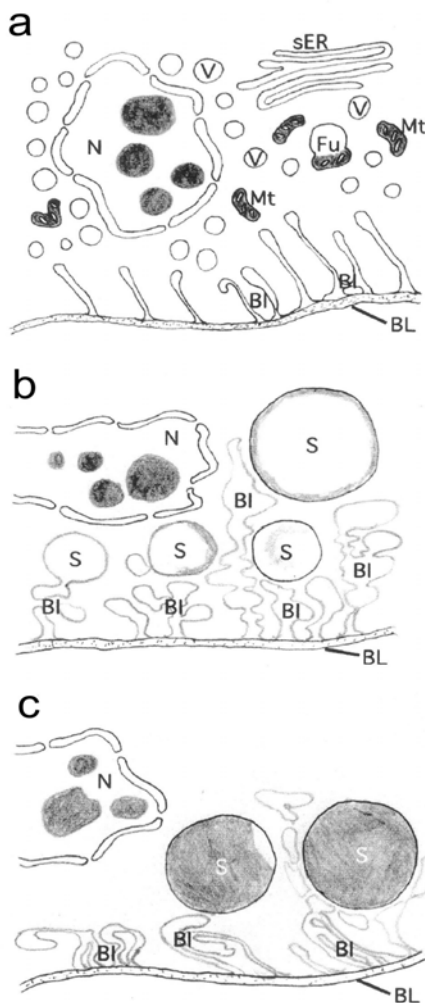
A kelést megelőző napon a bazális laminához kapcsolódó *BI*-k erősen megnagyobbodnak (27. a. ábra) és behatolnak a sejt citoplazmájába, melyek szerepe fontos lehet. A betüremkedések mellett különböző méretű gömb alakú struktúrák kezdenek felszaporodni (27. a-d. ábrák). Ezek eleinte kevésbé elektrodenzek, de fokozatosan azzá válnak. A kelés napján ezek a struktúrák viszont már igen elektrodenzek (*S*) és méretük, jellegük alapján ezek már „érett” *LD*-k (28. a,b. ábrák). A 29. (a-c.) ábrán sematikusán ábrázoltuk a *LD*-k feltételezett kialakulásának folyamatát a *PG* sejtben (Yokoyama és mtsai., 2003).



27. ábra: A *PG* sejtek bemutatása elektronmikroszkópos képek segítségével kelés előtt egy nappal. Az a. képen a bazális plazmamembránból szabálytalan alakú betűrődések (*BI*) látszanak. A b. és c. ábrákon a betűrődések mentén gömb alakú struktúrák láthatók, melyek elektrodenzek (*S*). A d. képen látható, hogy a nagy gömbökön az elektrodenz anyag a szélekre szorul. A méret skálák 1 μm -t jelölnek.



28. ábra: A *PG* sejtek bemutatása elektronmikroszkópos képek segítségével a kelést követően. Az a. képen az erősen elektrodenz gömb alakú struktúrák láthatók (*S*). A b. képen kevésbé elektrodenz struktúrák is láthatók, ellenben a környező citoszól erősen elektrodenz. A méret skálák 1 μm -t jelölnek

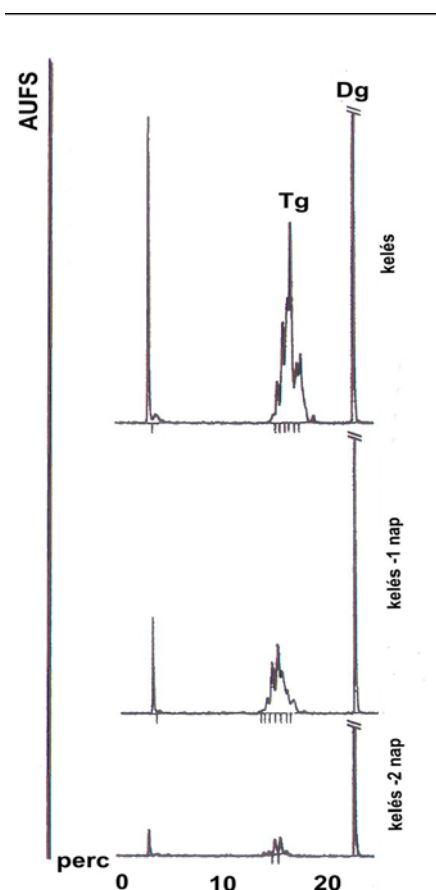


29. ábra: A *PG*-sejtben zajló dinamizmus sematikus ábrázolása a mikroszkópos képek alapján, azaz az *LD*-k kialakulása és fejlődése a kelést követő ideig.

Az a. ábra két nappal a kelés előtti állapotot mutatja, ahol jól megfigyelhető, hogy az alacsony elektrodenzitású *V*-k fuzionálnak az *Mt*-kkel (*Fu*). A b. képen különböző méretű (fejlődési állapotú) elektrodenzzé és egyre nagyobbá váló gömb struktúrák láthatók (*S1-S4*). A c. ábra már a kelés utáni állapotot mutatja *S5* és *S6* nagyobb méretű képletekkel.

VII/3/6. A *bombykol* termelő *PG* sejtek citoplazmatikus *LD*-k kémiai elemzése

- a) Az *LD*-k kémiai elemzését megelőzte itt is **egy eljárás kidolgozása, melynek révén megbízhatóan –mennyiségi és minőségi értelemben is– kivontuk a vizsgálandó zsírszerű anyagokat a *PG* sejtekből**. Végül az acetonos kivonás mellett döntöttünk, mint azt a VII/2/7. alfejezetben részletesebben leírtam.
- b) A kivonási eljárás eredményeképpen kapott extraktumból a továbbiakban a nem-poláros zsírok elemzésére összpontosítottunk. Ennek köszönhetően nyertük azokat az elsődleges frakciókat, melyeket továbbtisztítottunk (30. ábra). Esetünkben kizárólag a *Tg*-ket vizsgáltuk tovább, ugyanis láthatóan ezek mutattak mennyiségi változást pl. a bábállapot és a kelést követően ill. később napszakosan is. A *TLC* rutin ellenőrzések is ezt igazolták. A futtatásokhoz az *n*-hexán:etilacetát (9:1) elegy bizonyult a legjobbnak.

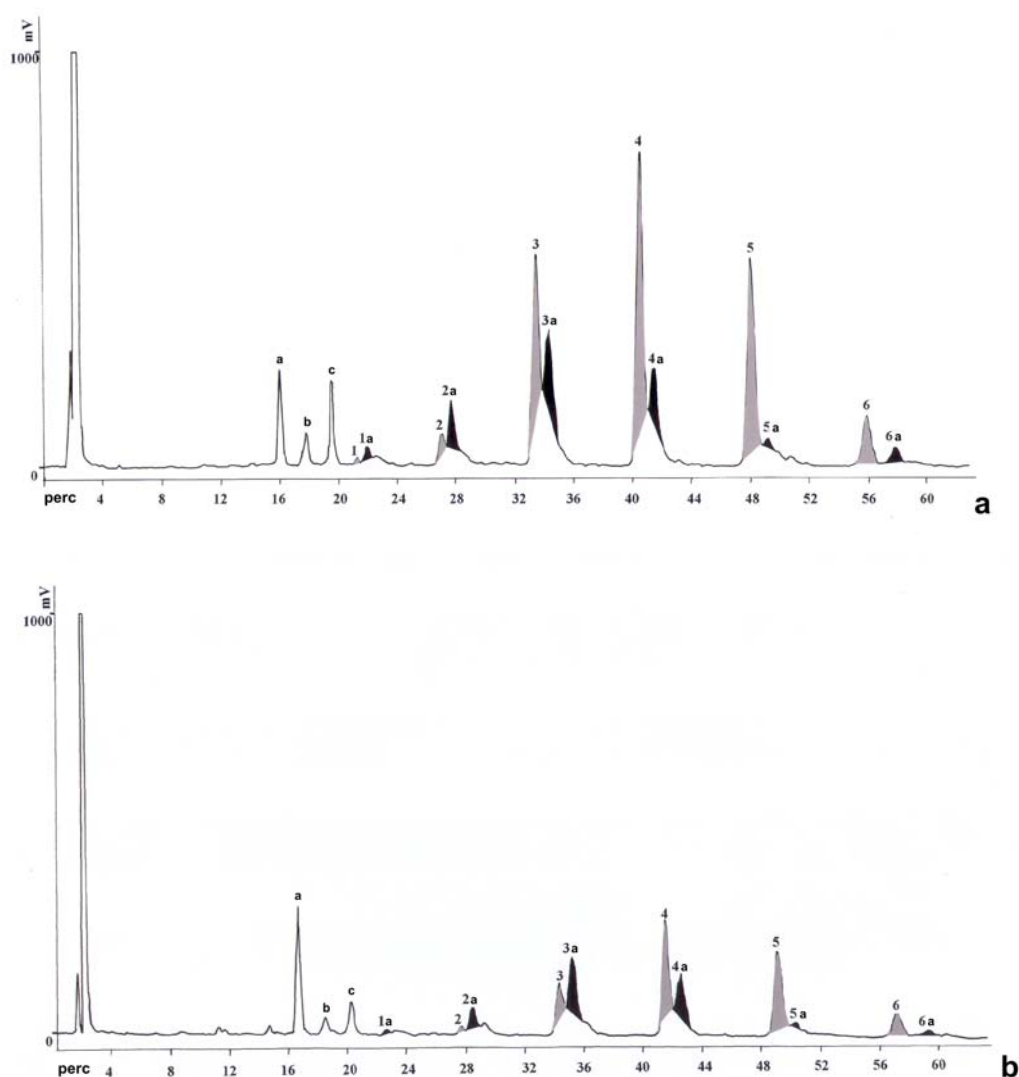


30. ábra: *PG*-ből készült acetonos kivonat nem-poláros zsírjainak normál fázisú *HPLC*-n történő szétválasztása *Senshu-Pak PEGASIL* szilika oszlopon.

UV-detekció 230 nm (kelés előtt két nappal, egy nappal, valamint keléskor). (A= *n*-hexán:ecetsav; 99:1 és B= *n*-hexán:izopropanol ecetsav; 96:3:1; 0-100% B 20 perc alatt; 1 ml/perc). A *Dg*-k mindig azonos mennyiségben voltak kimutathatók, míg a *Tg*-k jelentősen nőttek.

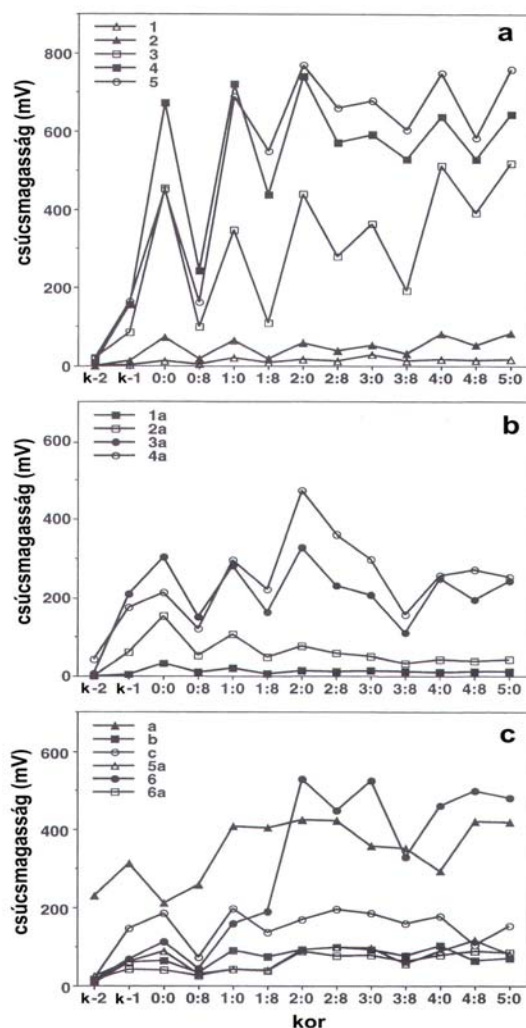
- c) A *Tg*-ket tartalmazó előtisztított frakciókat hét napon keresztül vizsgáltuk a kelési naptól kezdve azonban naponta kétszer, hogy a fény, valamint fluoreszcenz mikroszkóppal végzett vizsgálataink eredményét relatív mennyiségi *Tg* vizsgálatokkal is összevethessük. A 31. a. és b. ábrákon két fontos időpontban kapott jellegzetes kromatogramot ábrázoltunk, amit az

ELSD-detektor segítségével regisztráltunk (mV). Jól látszik, hogy **a de. 10 órakor ill. du. 18 órakor vett minták között lényeges mennyiségi eltérés van az egyes komponensek között.** A csúcsokat számokkal és ehhez kapcsolódó betű, vagy csak betű kódokkal láttuk el és három fő csoportra osztottuk azokat. Valamennyi időpontban több párhuzamos futtatást (min. kettő) végeztünk, majd a három különböző csoport eredményeit kiértékeltek, amit a 32. a-c. ábrákon ábrázoltunk. Ezekről az eredményekről is **megállapítható, hogy fluktuációjuk összhangban van a fluoreszcenz mikroszkóp segítségével meghatározott *LD* méret és mennyiségi eredményekkel** (20-24. ábrák). Az is megállapítható továbbá, hogy a kelést követő harmadik naptól ingadozásuk csökken, tompul.



31. ábra: Az előtisztított *Tg* mintákat tartalmazó frakciók *RP-HPLC*-vel *Senshu-C₂₂* oszlopon végzett elválasztás kromatogramja *ELSD*-detekció alapján.

a. ábra keléskor, b. ábra kelés után 8 órával vett minta kromatogramja. (A= *AcN*:*EtOH*; 6:4; B= *AcNi*:*EtOH*; 2:8; 0-100% B 60 perc alatt; 1,5ml/perc). A fő csúcsokat 1-6-ig (szürke szín), míg a mellékcúcsok 1a-6a-ig (fekete szín) jelöli. A szám nélküli egyéb csúcsokat a-c jelöli.



32. ábra: A 31. ábrán bemutatott és azonosított csúcsok magassági fluktuációja *RP-HPLC* kromatogramok alapján, *ELSD*-detektor segítségével.

A mintavételi időpontok kelés előtt két nappal, kelés előtt egy nappal, valamint keléskor (0:0) és nyolc órával később (0:8) továbbá azt követően öt napon keresztül voltak, azonos időpontokban. Az a. ábrán 1-5-ig csúcsok, a b. ábrán 1a-4a mellékcúcsok, míg a c. ábrán az 5a, 6a mellékcúcsok és a-c egyéb csúcsok láthatók. Egy-egy pont felvételezése legalább két független futtatás eredményéből származik. Az adat 0,2 *PG* ekvivalensnyire vonatkozik.

d) A jellegzetes *Tg* csoportok mennyiségi változását követően elvégeztük valamennyi frakció minőségi analizisét. A csúcsok kézi gyűjtését követően még egy *HPLC* tisztításnak vetettük alá azokat (lisd.:VII/2/7. d.). A számított ill. mért molekula tömegek alapján az 5. táblázaton bemutatott *Tg* összetételt határoztuk meg. **Megállapítottuk** továbbá, **hogy összesen ötféle *Fa* található 16 különböző kombinációban a *Tg*-kben** (Matsumoto és mtsai., 2002): Δ^{11} -hexadecenoát, $\Delta^{10,12}$ -hexadekadienoát, Δ^9 -oktadecenoát, $\Delta^{9,12}$ -oktadekadienoát és $\Delta^{9,12,15}$ -oktadekatrienoát.

Az eredményekből feltétlenül kiemelendő, hogy a jelentős fluktuációt mutató csúcsok esetében (elsősorban 1-5 főcsúcsok; 32. a ábra) mindig kimutatható volt a $\Delta^{10,12}$ -hexadekadienoát, ami a *bombykol* előanyaga. Fontos továbbá, hogy az 1a-4a mellékcúcsok között (32. b. ábra) is megtaláljuk vagy a $\Delta^{10,12}$ -hexadekadienoátot, vagy pedig előanyagát (közti-terméket) a Δ^{11} -hexadecenoátot. A harmadik csoport (32. c. ábra) csúcsai között ugyan szintén felfedezhetünk bizonyos fluktuációt, de arra is fény derült, hogy az a, b, c, csúcsok nem *Tg* természetű zsírok.

(A ábra) csúcs#		1	2	3	4	5
[M+H] ⁺ tömeg	számított	795,7	823,7	825,7	827,7	855,7
	mért	795,6	823,7	825,8	827,8	855,7
	<i>sn-1</i>	C16:2	C16:2	C16:2	C16:2	C18:1
	<i>sn-2</i>	C16:2	C18:2	C18:1	C18:1	C18:1
	<i>sn-3</i>	C16:2	C16:2	C16:2	C16:1	C16:2

(B ábra) csúcs#		1/a	2/a	3/a	4/a	
[M+H] ⁺ tömeg	számított	821,7	849,7	851,7	853,7	
	mért	821,6	849,7	851,7	853,8	
	<i>sn-1</i>	C16:2	C18:3	C18:3	C18:3	
	<i>sn-2</i>	C18:3	C18:3	C18:1	C18:1	
	<i>sn-3</i>	C16:2	C16:1	C16:2	C16:1	
			és/vagy		és/vagy	
	<i>sn-1</i>		C18:2		C18:2	C18:2
	<i>sn-2</i>		C18:3		C18:2	C18:1
	<i>sn-3</i>		C16:2		C16:1	C16:2

(C ábra) csúcs #		6	5a	6a
[M+H] ⁺ tömeg	számított	857,8	881,8	883,8
	mért	857,7	881,7	883,7
	<i>sn-1</i>	C18:1	C18:3	C18:2
	<i>sn-2</i>	C18:1	C18:1	C18:1
	<i>sn-3</i>	16:1	C18:1	
			és/vagy	
			C18:2	
			C18:2	
			C18:1	

„Fa” bold kiemelés szerkezetileg és pozícionálisan is igazolt

5. táblázat: Az *LD*-kből kivont és azonosított *Tg*-k szerkezete, melyeket *RP-HPLC*-vel valamint normál fázisú *HPLC*-vel tisztítottunk. (Csúcsok azonosítását lsd. 31. ábrán).

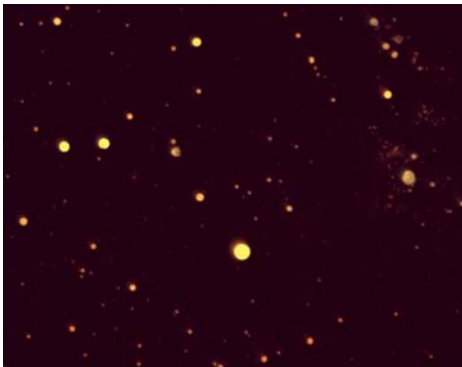
A meghatározások *FAB-MS*-el, valamint *MS-MS*-el történtek. A *Fa*-k pozíciója enzimatis lipolizist követő került meghatározásra. C16:1= Δ^{11} -hexadecenoát, C16:2= $\Delta^{10,12}$ -hexadekadienoát, C18:1= Δ^9 -oktadecenoát, C18:2= $\Delta^{9,12}$ -oktadekadienoát és C18:3= $\Delta^{9,12,15}$ -oktadekatrienoát.

Végezetül amint az az 5. táblázatban is látszik enzimatis hidrorízis segítségével (disznó pankreáz) meghatároztuk, hogy az azonosított $\Delta^{10,12}$ -hexadekadienoát melyik pozícióban található. Megállapítottuk, hogy az elsősorban az *Sn-1* és/vagy 3-as helyen található, praktikusan biztosítva a könnyű hozzáférhetőséget a specifikus *L* számára. Az *Sn-2*-es helyen pedig gyakran találtunk C₁₈- as telítetlen *Fa*-t.

VII/3/7. A citoplazmatikus *LD*-k non-destruktív izolálása további vizsgálatok céljából

A *LD*-k non-destruktív izolálása azért vált szükségessé, hogy a hozzájuk kapcsolódó *LDAP*-k és/vagy ún. (feltehetően) hormon szenzitív *L*-ek izolálásához és azonosításához biztosítsuk a kiindulási anyagot. A módszernek csak orvos-biológiai előzményei voltak, tehát a VII/2/8. pontban leírt **Anyag és módszer** alfejezet jelentős része, ténylegesen ide kapcsolódó eredmény is egyben.

A több lépcsős kivonási eljárás, homogenizálásokat és kétszeres ultracentrifugálást igényelt. Az ún. zsír-réteg szeparálása fagyasztás, majd metszés útján pedig metodikailag teljesen új eljárás volt tekintettel a rendelkezésre álló kevés kiindulási biológiai mintára. Az eredeti módszer patkányokra és azok zsírszövetének feldolgozására volt ugyanis alkalmas (Sato és mtsai., 2002). A *LD*-k ellenőrzését pedig a már jól bevált *Nilus*-vörös festési eljárással végeztük fluoreszcensz mikroszkóppal (33. ábra).

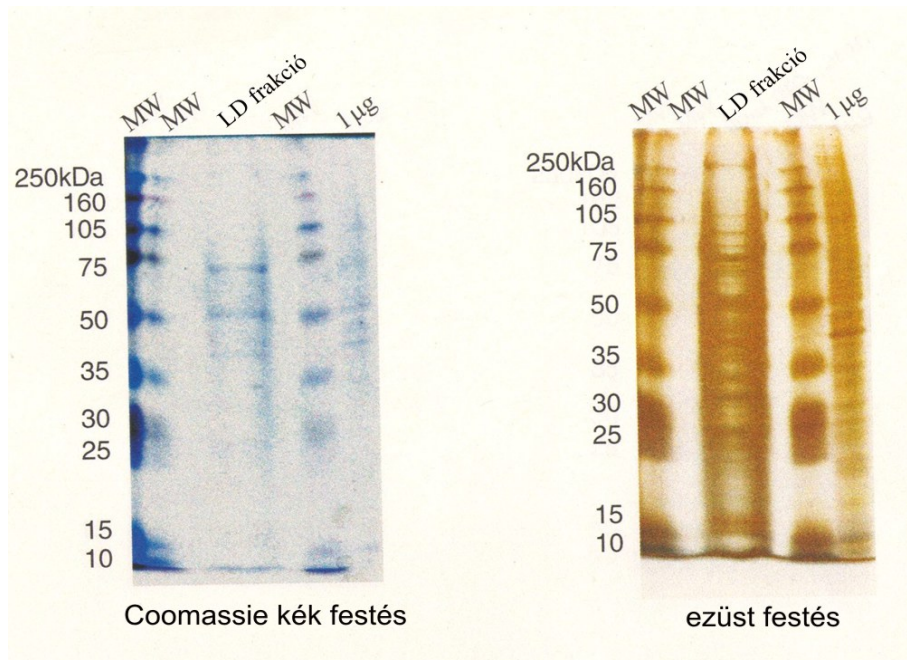


33. ábra: *Nilus*-vörös festéssel és fluoreszcensz mikroszkóppal megvizsgált *LD*-k (szuszpenzió). Az *LD*-ket ún non-destruktív eljárással vontunk ki.

Az *LD*-k izolálását követően, azért, hogy a kapcsolódó *LDAP* proteineket azonosíthassuk hagyományos *SDS-PAGE* elválasztásnak vetettük alá. A 34. ábrán *Coomassie* kékkel, valamint ezüsfestéssel festett gélek láthatók. Az *LD*-k felületéről kivont proteineket a gélből ezek után kivágtuk, majd enzimatikusan emésztettük, *HPLC*-vel frakcionáltuk, melyet *MS* meghatározás és peptid szekvenálás követett. Az így nyert elsődleges eredmények alapján **sikerült néhány enzim és/vagy protein azonosítása:**

***B.mori*-aktin, arginin-kináz, anti-kimotripszin-II, gliceraldehyd-3-foszfát dehidrogenáz.**

A bemutatott előzetes eredmények biztatóak (Fónagy és mtsai., 2005) és mindenképpen lehetőséget kínálnak arra, hogy ezzel a módszerrel *LDAP*-ket kivonjuk, valamint specifikus *L*-ek azonosítása is megtörténhessen a későbbiekben.



34. ábra: *SDS-PAGE* (14%) elválasztása az *LD*-khez kapcsolódó és azok felületéről leválasztott proteineknek (*LDAP*).

Molekulatömeg standardként (*MW*) *BIO-RAD* készítmény szolgált. Az így szétválasztott proteinek kerültek kivágásra, majd további feldolgozásra, analízisre.

VII/3/8. Az *Lf*-ek és *LTP*-k részleges elválasztása és tisztítása az általuk szállított zsírszerű anyagokkal összefüggésben

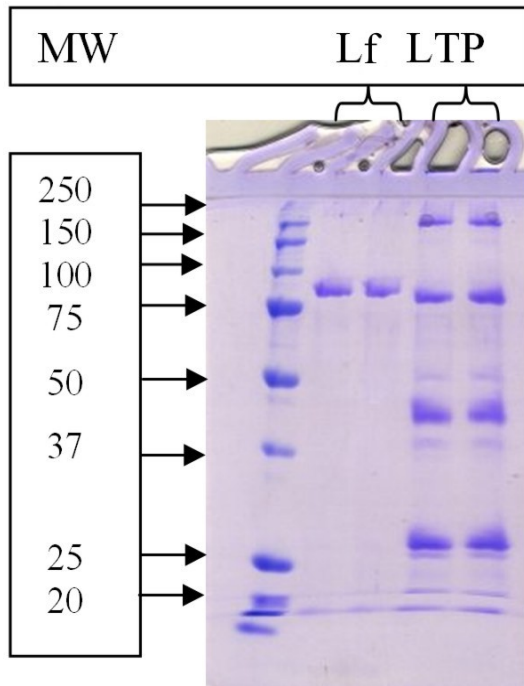
A vérnyirokban keringő *LDLf*-ek és a *HDLf*-ek, valamint *LTP*-k kivonását illetően alkalmazott módszerek (Tsuchida és mtsai., 1997, 1998) rendelkezésre álltak és azok hatékonyságát és sikerességét hagyományos *SDS-PAGE* eljárással ellenőrizhettük. A 35. ábrán kelés előtti egy napos bábokból vett vérnyirok minta *Lf* és *LTP* mintázata látszik, mely megfelelő egyezést mutatott a korábbi közleményekkel. A tájékozódást követően elvégeztük a kivonathból a zsírok kinyerését, kirázással *Folchs* reagens segítségével.

A kísérletekhez kelést megelőző napokban majd keléskor, utána, valamint dekapitálást követően is vettünk mintákat és igyekeztünk összevetni azokat. Az előzetes eredmények azt mutatták, hogy a kivont *Dg*-k az *Fa*-k különféle keverékeit tartalmazzák:

Δ^9 -oktadecenoát > hexadecanoát >> oktadecanoát > $\Delta^{9,12}$ -oktadekadienoát >> nyomnyi hexadecenoát és $\Delta^{9,12,15}$ -oktadekatrienoát (Fónagy és mtsai., 2005).

Az azonosított *Fa*-k jórészt megtalálhatók a korábban analizált *LD*-k *Tg* alkotóelemei között (Lsd. VII/3/6.). A *bombykol* előanyagának számító $\Delta^{10,12}$ -hexadekadienoátot azonban

nem sikerült egyáltalán azonosítani ill. ennek előanyagát Δ^{11} -hexadecenoátot sem, **ami megerősítette azt, hogy az kizárólag a *PG*-kben *de novo* szintetizálódik**, míg a *Tg*-k további alkotórészeit (egyéb *Fa*-k) ellenben a táplálékból származtathatjuk és amelyek a vérnyirok áram segítségével jutnak el a célszervig, majd felvételre kerülnek.

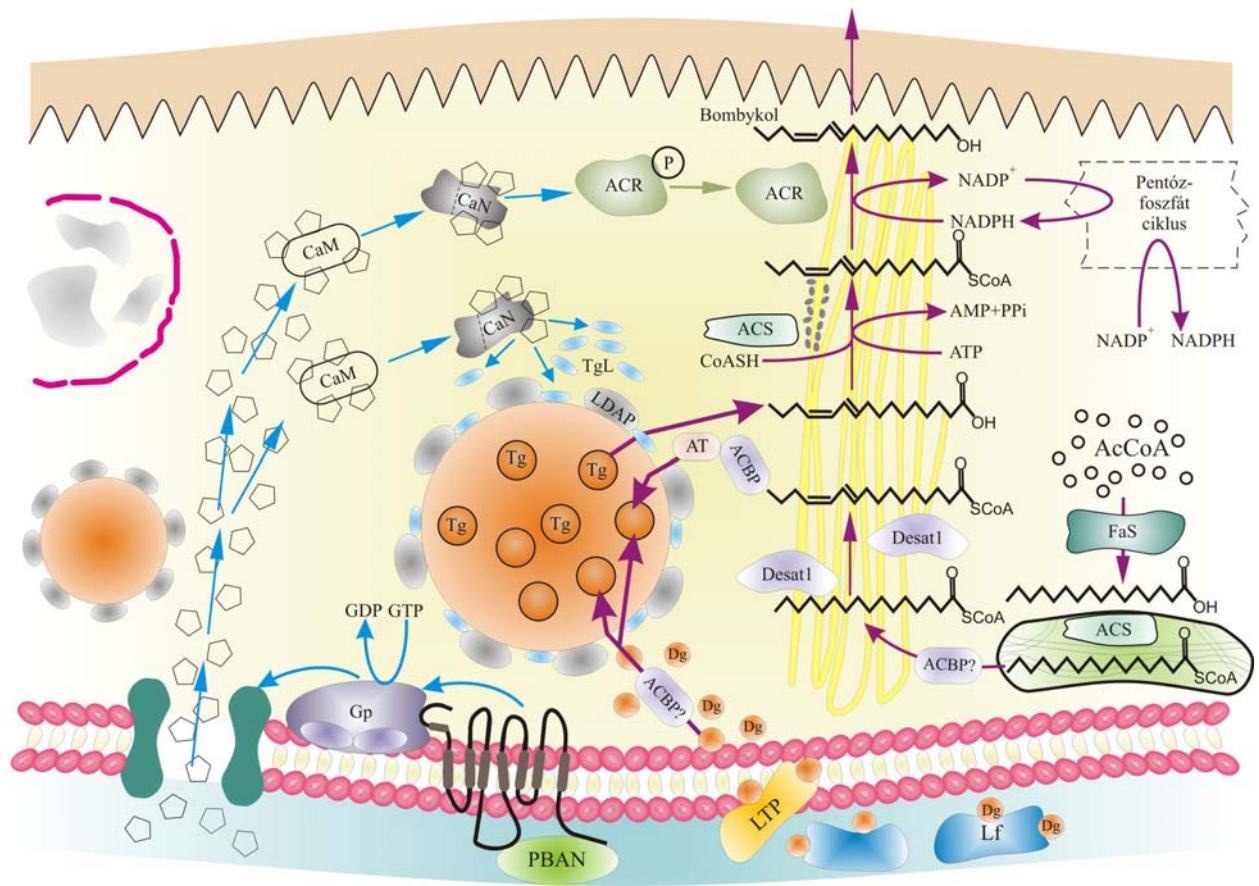


35. ábra: *SDS-PAGE* (14%) elválasztása a vérnyirokból tisztított *Lf*-eknek és *LTP*-knek. A minták egy nappal a kelés előtti nőstényekből származtak. A mintázat megfelelt a várakozásnak (Tsuchida és mtsai., 1997, 1998). Ezt követően került sor a *Dg*-k kivonására, elválasztására és analizésére.

VII/4. Megvitatás

A **CÉLKITŰZÉSEK**-ben felvázoltam, hogy a *PBAN* hatásmechanizmusának, jelátadási rendszerének részletes feltárására vállalkozunk a selyemlepke (*B. mori*) *PG*-ben, a feromon-szintézis és azt kísérő sejttani eseményeinek folyamatában a legkorszerűbb eszközök igénybevételével, a vizsgálati módszerek széles spektrumának alkalmazásával.

Az egy évtizedes kutatómunka –a japán kutatókkal karöltve– egy teljesen egyedülálló igen részletes modell kidolgozását tette lehetővé (36. ábra). Ennek a modellnek a kidolgozásához az **Előzmények**ben vázolt korábbi ismeretek biztosították az alapot (Fónagy és mtsai., 1992a,b; Ozawa és mtsai., 1993,1995; Matsumoto és mtsai. 1995). A más fajokból újabban ismertté vált részeredmények ismertetése mellett (és előtt) először a 36. ábra bemutatására és rövid értelmezésre vállalkozom.



36. ábra: A *PBAN* hatásmechanizmusa és jelátadási folyamata (→), valamint a *bombykol* bioszintézise (→) a *B. mori* PG sejtjeiben. (Részletes magyarázatot lsd. a szövegben).

A vérnyirokban (halvány türkizkék) keringő *PBAN* a *Gp* kapcsolt receptorhoz történő kötődést követően külső Ca^{++} áramlik be a megnyíló Ca^{++} csatornán keresztül. (*Bom*)-*CaM*-komplex keletkezik, ami indukálja a *CaN* (*PP2B*) enzimrendszert, serkentve a *bombykol* bioszintézisében kulcsszerepet játszó *ACR*-t (*B. mori*-*PG-FAR*). A végső redukciós lépésen túlmenően a *PBAN* aktiválja a (hormon szenzitív) *TgL*-eket melyeket a *LD*-khez (nagy narancssárga körök) kapcsolódó proteinek (*LDAP*) kötnek le (a jelátadási folyamatot kék nyilak jelölik az ábrán). A lipolízis eredményeképpen, a napi szinten dinamikusan változó cseppekből szabaddá válnak a *Tg*-kben „tárolt” *Fa*-előanyagok, melyek a sejtek citoszóljában (halvány sárga háttér) *FaS* által *AcCoA*-ból, továbbá *Mt*-kben (halványzöld, csöves-vezikuláris szerkezetű organelum) zajló folyamatos *Fa*-szintézis (*Acil-CoA*-szintetáz: *ACS*), majd telítetlen kötések (bifunkcionális deszaturáz: *Desat. I*) kialakulását követően keletkeznek. Ez utóbbi reakciók már valószínűleg az *acil-CoA*-kötőfehérjék (*Acyl-CoA Binding Protein; ACBP*) által a *sER*-hez (sárga lamellák) történő szállítás után következnek be. Az *acil*-transzferáz (*Acyl-transferase*;

AT) a *Fa*-vá alakítást végzi el. A *Tg*-k a „fajspecifikus” *Fa*-n ($\Delta^{10,12}$ -hexadekadienoát) kívül a vérnyirok *Lf*-jei által szállított, táplálékból származó, majd *LTP*-k segítségével a sejtbe juttatott *Dg*-kből épülnek fel. Az *LD*-kből szabaddá váló specifikus *Fa* a mikroszómákhoz (kis ovális szürke testek) kapcsolódó *ACS* segítségével konvertálódik, ill. a közti terméket végül az aktivált *ACR* alkohollá redukálja. A *bombykol* végezetül a sejt *Mv*-ken (fogazott szerkezet), valamint kutikulán (világos barna sáv) a mirigy felszínére jut, és onnan a légterbe (az *Fa*-k, ill. *de novo bombykol* szintézis folyamatát lila nyilak jelölik).

A folyamatot kicsit részletesebben érdemes áttekinteni egyéb fajokból nyert részeredmények tükrében, ugyanis, mint korábban hangsúlyoztam ilyen átfogó (farmakológiai, biokémiai, molekuláris biológiai, valamint morfológiai) tanulmányozásra egyetlen más faj esetében sem került még sor, ami a feromontermelést illeti.

A *bombykol* termelés folyamat áttekintése szempontjából először is komoly áttörést jelentett, hogy Hull és mtsai. (2004) több éves megfeszített munkának köszönhetően sikeresen klónozták és jellemezték a *Bom-PBANr*-t. Ez a 46 kD molekula tömegű *Gp* kapcsolt receptor csak a *PG*-ben fejeződik ki, és specifikusan reagál a *PBAN*-re oly módon, hogy az extracelluláris Ca^{++} beáramlását képes serkenteni dózis-függő mértékben. Konfokális mikroszkópos vizsgálatok azt is megerősítették, hogy a *PBAN* ténylegesen a receptor internalizációját segítik elő, mégpedig oly módon, hogy a receptor 67 aminosavból álló hosszabb C-terminálisa játszik ebben döntő szerepet (Hull és mtsai., 2005). A *Hez-PBANr* és *Bom-PBABr* központi része között 82%-os az azonosság, de különbözik az N-terminális végük, ill. ennél lényegesen nagyobb mértékben az említett sokkal hosszabb C-terminális miatt. Az egész jelátadási rendszer közötti különbségség egyik kulcsának tekintjük ezt a jelentős eltérést, ugyanis Hull és mtsai. (2005) ezért felvetették, hogy a *Bom-PBANr* egy klatrin-függő kináz jelátadást indukál (ami szintén Ca^{++} függő) és nem is a *Gp*-kapcsolt kináz rendszer a kulcs (ld. még **VIII. fejezet**).

A receptorral történő kapcsolódást követően megindul a Ca^{++} nagymennyiségű beáramlása, melynek nélkülözhetetlen szerepét számos vizsgálat állította és erősítette meg (Fónagy és mtsai., 1992a; Ozawa és mtsai., 1993, 1995). Az eredmények receptor-aktivált Ca^{++} csatorna szerepét hangsúlyozzák a *B. mori*-ban, szemben a feszültség-függő Ca^{++} csatornáéval a *H. zea*-ban. A *B. mori*-ban tapasztaltakkal hasonló következtetésre jutottunk a *S. litura* esetében (Fónagy és mtsai. 1992a,b; Ozawa és mtsai., 1995) is, ill. ezt állapították meg a kukoricamoly, *Ostrinia nubilalis*-ban is (Ma és Roelofs, 1995) a miénkhez egyébként nagyon hasonló kísérletek elvégzése után.

A *Bom-CaM* izolálása a citoszolikus frakcióból megerősítette feltevésünket abban, hogy a *PBAN* jelátadási mechanizmusban döntő és nélkülözhetetlen szerepe van ennek a Ca^{++} kötő

modulációs proteinek (Iwanaga és mtsai., 1998), ugyanis farmakokémikáliák segítségével ez részben már bizonyítást is nyert (Matsumoto és mtsai., 1995). Az azonosított *Bom-CaM* szerkezete teljesen megegyezik a *D. melanogaster*-ből molekuláris biológiai eszközökkel meghatározott és előrejelzett *CaM*-mal (Smith és mtsai., 1987). Ott is, mint a *B. mori* zsírtestből izolált *CaM* esetében is (Bodnaryk és Morishima, 1984) hiányzik az ϵ -trimetillizin. Ami az alapvető szerkezetet illeti mindössze 6 aminosavban tér el a marha-agy *CaM*-tól (Watterson és mtsai., 1980) és azon belül is a 99. ill. 147. helyen található F ill. S. aminosavak viszont a gerinctelenek általános sajátága (Takagi és mtsai., 1980; Toda és mtsai., 1981). Természetesen a *Bom-CaM* esetében is jól beazonosítható az a négy Ca^{++} kötő domén rész, ami jellegzetes háromdimenziós „hurok” szerkezetet alkot (Babu és mtsai., 1985). Mindezek alapján megállapítható, hogy egy igen fontos, de konzervatív struktúrát sikerült azonosítanunk és modellünkbe illesztenünk.

A *PBAN* jelátadási folyamatának vizsgálatában döntő fontosságú volt a *CaN* szerepének egyértelmű tisztázása (Fónagy és mtsai., 1999). Ismert, hogy egyes jelátadási eseményekben elsősorban ennek van szerepe és pl. nem az IP_3 rendszer által közvetített kaszkádnak (Cohen, 1989). Egyes általános klasszikusnak számító foszfatáz inhibitorokkal ugyan sikerült a *TKYFSPRLamid PT* hatását gátolni az izolált *in vitro* *PG* biotesztben (Matsumoto és mtsai., 1995), de sokkal hitelesebb következtetésekre juthattunk specifikus *CaN* inhibitorok használatával segítségével. A *CsA* és az *FK 506* a gyógyászatban kitűnően bevált specifikus *CaN* inhibitorok (Kunz és Hall, 1993; Liu, 1993), ezért az ágensek segítségével nyert eredményeknek köszönhetően a *CaN* szerepe egyértelművé vált. Külön megerősítette eredményeinket az, hogy sikerült egy továbbfejlesztett újszerű eljárással működőképes, selyemlepke *PG*-ből származó, mikroszóma frakciót nyerni. Ezek segítségével is bebizonyosodott, hogy a citoszól frakcióban található a jelátadási mechanizmusban nélkülözhetetlen *CaM*, valamint ehhez kapcsolódóan a *CaN*, ill. a mikroszóma frakcióban a *de novo bombykol* szintézishez szükséges apparátus. A *CaN* (*PP2B*) jelenlétét egyébként *SDS-PAGE*, valamint *Western-blot* kimutatási eljárással is igazoltuk. Ez utóbbiak segítségével nyilvánvalóvá vált, hogy marha-agy *CaN*-hez hasonlóan a *PG* sejtekben is található egy *A* katalitikus, specifikus alegység és egy *B* konzervatív alegység (Klee és mtsai., 1985, 1987). Ezt hamarosan megerősítették Yoshiga és mtsai. (2002) eredményei, mely szerint egy 495 aminosavból álló katalitikus *CaN-A* alegységet és egy 170 aminosavból álló *CaN-B cDNS* alegységet klónoztak. Az előbbi mintegy 85%-os azonosságot mutat a *D. melanogaster CaN-A*-val (Guerini, és mtsai., 1992), ill. 82%-ot az emberivel. A *CaN-A* egységen jól azonosítható az *CaN-B* kapcsolódó, *CaM*-kapcsolódó, valamint autoinhibitor-domén, a *CaN-B* egységen viszont a négy Ca^{++} kötő rész. Különösen figyelem-

reméltó az a megállapítás, hogy a gének már lárvakorban is expresszázódtak, a *PG*-ben viszont a kelést megelőző harmadik naptól (báb korban) lesz egyre intenzívebb a génkifejeződés, ami a kelést követően is jól kimutatható és nyomonkövethető. A 36. ábrán bemutatott modellünk szerint tehát a *CaN* nemcsak abban játszik szerepet, hogy defoszforiláció révén stimulálja a kulcsfontosságú *ACR*-t (részletesebben lsd. lentebb), hanem abban is, hogy aktiválja a *TgL*-eket. Ezért is említjük ezeket „hormon szenzitív” *L*-eknek, jóllehet ismereteink, még csak igen korlátozottak az *LDAP* és/vagy kapcsolódó *TgL*-ek tekintetében. Egyet azonban tudunk, hogy a *PBAN*, vagy bármilyen *FXPRLamid* végű neuropeptid biztosan befolyásolja a *TgL*-eket, valamint azt, hogy az *LD*-k felületéhez kötődjenek és aktiválódnak stb. Feltevéseinket azonban elsősorban gerinces analógiákra alapozzuk (Egan és mtsai., 1992; Syu és Saltiel, 1999; Clifford és mtsai., 2000) ill. a zsírmobilizációt illetően átfogó ismereteink a rovar zsírtestre vonatkoznak, ahol ellenben az *AKH* neuropeptidek játszanak kulcsszerepet (Shapiro és mtsai., 1988; Ryan és van der Horst, 2000). Mint tudjuk a lipolízis tekintetében az *AKH* jelátviteli rendszere –amint azt korábban a II/4.C alfejezetben leírtam– a *cAMP* szint megemelkedésével működik és serkenti/aktiválja a *PK*-kon keresztül a *TgL*-eket (Gäde és Auerswald, 2003). A folyamatban –azaz, jelen esetben az *LD*-k dinamizmusában– még sok megválaszolatlan kérdéssel állunk szembe.

A jelátviteli rendszer áttekintése után pedig áttérek a *de novo bombykol* szintézis lépéseire ill. „kitérőire”. A folyamat kulcslépéseit a 36. ábrán lila nyilak jelölik. Kutatásaink megkezdésekor is ismert volt, hogy a *bombykol* –hasonlóan más lepkefajokhoz (Bjostad és mtsai., 1987)– *AcCoA*-ból kiindulva zsír-acil intermediereken keresztül (palmitát) szintetizálódik *FaS* által. Ezt követően *Fa*-vá (palmitinsavvá) alakul az *ACS* enzim segítségével (*Mt*-kben). Más fajoknál ekkor következik be a láncrövidülés (vagy hosszabbodás a szintézis folytatásával ténylegesen), viszont a résztvevő enzimekről pontosabb ismereteink meglepő módon még a mai napig nincsenek a rovarokat illetően. Általában az a nézet uralkodik, hogy a rovar sejtek rendelkeznek azzal a képességgel, hogy hosszabb *Fa*-kból rövidebbet csináljanak (Stanley-Samuelson és mtsai., 1988). Hashimoto (1996) szerint ez egy részleges β -oxidáció, ami a peroxisómákhoz köthető.

A következő fontos mozzanat a fajspecifikus telítetlen kötések létrehozása (Z10, majd Z12 kettőskötések) esetünkben egy bifunkcionális *Bom-Desat1* által (Moto és mtsai., 2004). Fontos megemlíteni, hogy a *bombykol* bioszintézis folyamatát részletesen feltáró vizsgálatok és résztvevő enzimek azonosítása, majd klónozása során először két nagyon hasonló (98%-ban) *Desat1* és -2 meglétét feltételezték és írták le (Yoshiga és mtsai., 2000). Ezeket 61%-ban pl. hasonlóan találták a *T. ni*-ben leírttal (Knipple és mtsai., 1998). A *T. ni*-ben később sikeresen

klónozták a Δ^9 -*Desat* enzimet is (Liu és mtsai., 1999). Más fajokban egyébként –annak ellenére, hogy közismert, hogy létezik még Δ^5 , Δ^{10} , továbbá Δ^{14} kettős kötés is a fajspecifikus feromon elegyekben– a *Desat* enzimek szintén kevésbé ismertek (Blomquist és Vogt, 2003). Jeong és mtsai. (2003) voltak még sikeresek a *H. assulta* esetében, ugyanis ott ugyan hét *Desat*-ot izoláltak a *PG*-ből, de ténylegesen csak kettő, a Δ^9 -és egy Δ^{11} -*Desat* fejeződik ki és arányuk jól tükrözi az elegyben előforduló komponensek arányát. *B. mori* esetében később megállapították, hogy az egymást követő deszaturációt ténylegesen csak egy enzim, a *Desat1* végzi, mert a *de novo bombykol* bioszintézis során ez expresszáldódik és válik aktívvá és ezért is jelölik bifunkcionálisként (Moto és mtsai., 2004). Egyébként ez el is fogadható és értelmezhető, mert itt egy fő komponensen végbemenő egymás utáni reakcióról van szó. Ez utóbbi reakciók már valószínűleg az *ACBP*-k által a sima felszínű *sER* membránjaihoz történő szállítás után következnek be.

Az *Bom-ACBP* izolálása és karakterizálása a selyemlepke *PG* citoszólikus frakciójából szintén fontos részeredmény volt a modell kidolgozása során (Matsumoto és mtsai., 2001. Megj.: Az izolálási munkafolyamatba egyébként résztvettem melyek gyakorlatilag párhuzamosan zajlottak a *Bom-CaM* karakterizálásával, de a közlemény szerzői listájáról lemaradtam, ezért etikai okból, természetesen dolgozatomban azt külön nem is tárgyalom saját munkám részeként). Az *ACBP*-kről általában tudjuk, hogy *acil-CoA*-t képes kivonni foszfatidilkolin membránokból és specifikusan megkötni („szállítani”) és β oxidációhoz vagy glicerolipidek építéséhez juttatni (Rasmussen és mtsai., 1994). Mint a 36. ábrán látható több helyen is szerepet tulajdonítunk az *ACBP*-knek. Az *LD*-k *Tg* tartalmának felépítésében különösen döntő jelentőségűek, hiszen akár a sejtmembránon keresztül felvett *Dg*-k (vagy *Mg*), vagy a *de novo* szintetizált $\Delta^{10,12}$ -hexadekadienoát előanyag citoszólikus szállításában nélkülözhetetlenek. Fónagy és mtsai. (2001) által részletesen leírt *LD*-k kialakulásával és dinamizmusával kapcsolatos az a felfedezés is, hogy a *PG*-ből izolált *Bom-ACBP* expressziója egybeesik azok keletkezésével, tehát a kelést megelőző két napban jelenik meg, majd ezt követően fokozódik.

A *LD*-k szerepének vizsgálata, annak neurohormonális irányítottsága, valamint a cseppek tartalmának analízise a feromontermeléssel kapcsolatban teljesen új összefüggéseket tárt fel. Először is „feltérképeztük” és azonosítottuk a *bombykolt* termelő sejteket, szétválasztottuk a kutikulától, továbbá még élő kultúrában is tudtuk azokat tartani (Fónagy és mtsai., 2000). Az eredmény azért is különösen fontos, mert ugyan eddig több rovar *in vitro* bioteszt módszert honosítottak meg és használnak rutinszerűen, mint a *CA* mirigyet *JH* termelés (Stay és mtsai., 1994), *PTG*-t *ekdizon*, (Bollenbacher és mtsai., 1983), *Malpighi*-edényt folyadék kiválasztás, ionegyensúly (Coast és mtsai., 1990), viscerális izmokat mioaktivitás (ld: VI.

fejezet) tanulmányozására stb., vagy zsírtest sejteket alkalmaztak metabolikus folyamatok és neuropeptidek vizsgálatához (Keeley és mtsai., 1991), de ún. hormonszenzitív élő „sejtszuspenziót” alig (pl.: zsírtest: Asher és mtsai., 1984; *PTG*: Asahina és mtsai., 1994). A fluoreszcenz mikroszkópi vizsgálatok segítségével új megállapításokat tettünk, ami ráirányította a figyelmet arra, hogy az eddig néhány fajban leírt neutrális zsírokat tartalmazó *LD*-k (Percy és Weatherston, 1974) amelyek száma kelés után növekedett is (Lalanne-Cassou és mtsai., 1977), mindenképpen valamilyen raktározó funkcióval is rendelkeznek. A *T. ni* esetében figyeltek fel arra, hogy ezek a cseppek már a kelést megelőzően gyarapszanak, igaz méretben nem (Jefferson és Rubin, 1973). A *PG* sejtek ultramikroszkópos tanulmányozása (Yokoyama és mtsai., 2003), pedig segítettek abban, hogy sejtorganellumok szintjén követhessük nyomon a sejt kelés előtti, alatti, valamint utáni változásait és főképpen a *LD*-k kialakulását, amit a 29. ábrán külön be is mutattunk. A számos *Mt* külső membránja biztosítja a felületet az *ACS* enzim részére (Aas, 1971). Különösen fontos volt a jelentős mennyiségű *sER* megfigyelése, aminek a membrán rendszeréhez, mint tudjuk, pedig az *acil-CoA Desat1* kötődik. A feromontermeléssel, ill. a folyamat neuroendokrin irányításával összefüggésben egyébként mindössze két mikroszkópos vizsgálatról tudunk, nevezetesen a *H. zea*-ban (Raina és mtsai., 2000), valamint *O. nubilalis*-ban (Ma és Roelofs, 2002). *O. nubilalis*-ban egyébként próbaképpen mi is végeztünk *Nílus*-vörössel *LD* festéseket és fluoreszcenz mikroszkópos megfigyeléseket (a *B. mori*-ban alkalmazott módszer szerint) és megállapítható volt a nagymennyiségű, de igen kisméretű *LD*-k jelenléte, mely támogatja a *B. mori*-ban tapasztaltakat. Ismeretes, hogy közlemények alapján az *O. nubilalis*-ban a *B. mori*-hoz hasonlatos a jelátadási rendszer és ott is a végső redukciós lépés áll *PBAN* kontroll alatt (Ma és Roelofs, 1995)

A *LD*-k tartalmának analízise eredményeképpen megállapítottuk, hogy a *Tg*-ket kizárólag ötféle *Fa* építi fel és azon belül is a legnagyobb fluktuációt mutató *Tg* féleségek között mindig megtaláljuk a $\Delta^{10,12}$ -hexadekadienoátot, a *bombykol* előanyagát, mégpedig döntően az *Sn-1* és/vagy *Sn-3* pozícióban. Ehhez hasonló eredményt mutatott ki Foster (2001) *Epipyhas postvittana*-ban is. *H. virscens*-ben végzett vizsgálatok is kimutatták, hogy jelentős mennyiségű olyan zsír-acil (Z11-16-acil) található a *CoA*-észterekben, ill. a *Tg*-ben, amely a fő feromon komponens (Z11-hexadecenal) előanyaga (Foster, 2005). Az előanyag azonban feromontermelés csúcsával egyidőben található a legnagyobb mennyiségben, ugyanis feltehetően az utolsó lépésért felelős enzim (oxidáció az aldehid képzéséhez) nem képes a felhalmozott anyagot feldolgozni, hiszen mint korábban említettem a *Heliotis* fajoknál a *PBAN* az *Fa*-szintézis előtt fejt ki hatását és azt serkenti. Mint azt vizsgálatainkból láthattuk a *B. mori* esetében viszont a *PBAN* az előanyagok felszabadulását az *LD*-kből, valamint a végső redukciós

lépést is serkenti, tehát a *bombykol* termelés maximumánál a tartalékok jelentősen lecsökkennek. Korábban elsősorban jelöléses vizsgálatokat végeztek a közti termékeket és sorsukat illetően. Az *A. velutinana* esetében azt állapították meg, hogy nem történik át- ill. beépülés a tartalékokból (Bjostad és Roelofs, 1986), ellenben a *M. sexta*-nál egyértelmű összefüggést találtak (Fang és mtsai., 1995). Valamennyi fent említett vizsgálatra jellemző azonban, hogy kizárólag analitikailag közelítették meg a kérdést és pl. morfológiai, vagy más egyéb módszert nem használtak, ami alól egyedül a korábban említett Ma és Roelofs (2002) által közölt munka kivétel részben, *O. nubilalis*-ban.

Végezetül egy további megközelítés szerint a sejtmentes *bombykol* termelést a *CHAP Sup.* frakcióval oly módon meg tudtuk oldani, hogy a citoszólt különválasztva –amiben a jelátadás és bizonyos szállítási funkciókkal rendelkező proteinek találhatók (*CaM*, *CaN* és *ACBP*)– a mikroszómákhoz (membránokhoz) kötött enzimekkel végeztettük el szubsztrát és energia hozzáadásával (Fónagy és mtsai., 1999, 2000). Ez az eljárás volt egyébként segítségünkre abban, hogy korábbi feltevést igazolhattunk –mely szerint a végső redukciós lépést az *ACR* végzi–, ugyanis a reduktáz specifikus gátlószere a *kompaktin/-sav* a *CHAP Sup.*-ban is hatékonyan gátolta a *bombykol* szintézist, nem csak az *in vitro* *PG* tesztek során (Ozawa és mtsai., 1995; Ozawa és Matsumoto, 1996). A folyamat végső lépésének tárgyalásánál tudni kell azt, hogy a közelmúltban sikerült a *PG* specifikus *Bom-ACR* (*B. mori-PG-FAR*) izolálása, klónozása és funkcionális expresszálása (Moto és mtsai., 2003) is.

A fentiek figyelembevételével megállapíthatjuk, hogy egy igen komplex, sokféle vizsgálati módszert felölelő egy évtizedes összehangolt kutatómunka eredményeképpen sikerült egy egyedülálló modellt alkotni a *bombykol* termelést, valamint a folyamat *PBAN* általi irányítását illetően a selyemlepkében.

VIII. A *PBAN* HATÁSMECHANIZMUSA A *M. BRASSICAE*-BEN

VIII/1. Előzmények

A káposzta bagolylepkében folyó szexferomon termelődésről és annak élettanáról lényegesen kevesebb ismeret állt rendelkezésünkre, mint a selyemlepké esetében, a részletesebb vizsgálatok megkezdése előtt. Azon felül, hogy közismert volt a feromon pontos összetétele (Attygalle és mtsai., 1987), mindössze két vizsgálat szól arról, hogy a *PT/PBAN* neuropeptid vajon melyik szintetikus lépést befolyásolja, amit kizárólag egyetlen vizsgálat előz meg, ami ténylegesen néhány potenciális intermedier feltárását írja le (Bestmann és mtsai., 1987). Ez

utóbbi közlemény azonban csak arra hagyatkozik, hogy a kivonatban talált alkoholokat csekély szubsztrát specificitással egy eszteráz alakítja a végső acetáttá (Z11-16OAc). Ebből arra következtettek, hogy bizonyára ez a lépés nem áll közvetlen *PT/PBAN* kontroll alatt. Egy következő vizsgálat felvetette, hogy nem a *Fa*-szintézis, hanem inkább a Δ -deszaturáz az irányítás alatt álló kulcsenzim (Bestmann és mtsai., 1989). Ez utóbbi következtetést cáfolták meg Jacquin-Joly és mtsai. (1994), akik megállapították, hogy az *Fa*-szintézis kezdete áll hormonális kontroll alatt. Ez a kísérlet sor egyben azt is állította, hogy *PT/PBAN* neuropeptid humorális úton a célszerv sejtjeire hat, nincs szükség egyéb közvetlen idegi stimulusokra és *in vitro* körülmények között a *PG* igen megbízhatóan használható. Ez számunkra jó kiindulási alapot jelentett.

A *Heliothis* fajokból rendelkezésre álló akkori ismeretek a *PBAN* közvetlen hatásáról, a stimulust követő beáramló Ca^{++} fontosságáról, valamint a *cAMP* bizonyított szerepéről szóltak (Soroker és Rafaeli, 1989; Rafaeli és Soroker, 1989; Rafaeli és mtsai., 1990; Jurenka és mtsai., 1991b), ill. saját tapasztalatainkat is alapul véve (lsd. **IV. fejezet**) célszerűnek láttuk, hogy részletesebb *PBAN* jelátadási vizsgálatokat folytassunk farmakokemikáliák segítségével a *M. brassicae*-ben. Ezzel párhuzamosan szaporodtak ismereteink a *B. mori*-ban, ahol pedig igen csak megdőlni látszott a konvenció a klasszikusnak vélt neuropeptid jelátadási folyamatot illetően (Fónagy és mtsai., 1992a; Ozawa és mtsai., 1993, 1995), melyet viszont részletes vizsgálatok követtek (lsd: **VII. fejezet**). Ezek tükrében döntöttünk úgy, hogy a lehetőségekhez képest számos kísérletet elvégezzünk a *M. brassicae* *PG*-vel *in vivo* és *in vitro* körülmények között. Sok szempontból, hasonlatosnak véltük kísérleti objektumunkat a *Heliothis* fajokhoz.

A káposzta bagolylepke *PG*-jében történő *PT/PBAN* neuropeptid jelátadására vonatkozó kísérleteket az MTA Növényvédelmi Kutatóintézetében végeztem, egyes minták mérését azonban hazai ill. nemzetközi együttműködés keretében (MAKA, JFNo: 93/356) oldottam meg.

VIII/2. Anyag és módszer

VIII/2/1. Felhasznált rovar/törzs

M. brassicae: A tenyésztésre vonatkozó leírást lsd. IV/2/1. pontban. A bábok szexálását itt is elvégeztük és az *in vivo*, valamint *in vitro* biotesztekre minden esetben szűz, majd a kelést követő napon dekapitált és ismert korú nőtényeket használtunk.

VIII/2/2. A *cAMP* szerepének *in vivo* vizsgálata a *PBAN* jelátadási folyamatában

- a) Az *in vivo* vizsgálatokat alapvetően a már IV/2/2. pontban leírtak szerint rutinszerűen folytattuk. Először elvégeztünk a mi körülményeink között egy *PT* hatású (*FXPRLamid* neuropeptid dózis-hatás, majd ezt követően egy idő-hatás vizsgálatot. Minden esetben vizet (negatív kontroll), valamint különböző mennyiségű (1, 5, 10, 20 ng) szintetikus *Hez-PBAN*-t injektáltunk a dekapitált nőtény potrohába. Az idő-hatás vizsgálatához pedig később az optimális mennyiséget választottuk (azaz 10-20 ng). A *PG*-ket az inkubáció letelte után levágtuk és *n*-hexánban kivontuk a mérendő feromon-főkomponenst (*Z11-16OAc*), melyet korábban leírt módon (Jacquin-Joly és mtsai., 1994) szerint *Hewlett-Packard 5890 GC*-n mértünk meg. A kezeléseket legalább kétszer elvégeztük, alkalmanként három ismételtsben (azaz, három nőtényen).
- b) A feromon-főkomponens mellett elvégeztük a *cAMP* mennyiségének mérését, ami ténylegesen a kísérletek fő feladata volt (ld. VIII/2/4. pontot is). A *cAMP* szint változását az *Amersham "Cyclic AMP (³H) assay system"* módszerrel és *Amersham kit* segítségével vizsgáltuk. Metodikailag a legnagyobb nehézséget a kis mennyiség és relatíve kis ingadozás nyomkövetése jelentette, de végeredményben sikerült kidolgozni az egész folyamatot célunk megvalósításához. Röviden ez azt jelentette, hogy egy-egy mintához (méréshez) 10-10 *PG*-t használtunk fel (legalább két ismételtsben) és a használati utasításnak megfelelően 1ml *EtOH*-ban azonnal jégen homogenizáltuk, majd szonikáltuk a szöveteket, végül kettéosztottuk azokat. Öt-10 perces állást követően centrifugáltuk a mintákat és a felülúszót finoman eltávolítottuk, majd -50°C-on tároltuk mérésig. A mérésekhez a mintákat *N₂* alatt beszárítottuk, ezt követően a méréseket a protokoll szerint pontosan végrehajtottuk. A mérésekhez természetesen –szintén az előírásnak megfelelően– kalibrációs görbét készítettünk, hogy eredményeinket értékelhessük. Valamennyi ún. „C”-szintű izotópos munkát –a tényleges méréseket– az egykori Kertészeti Egyetemen (Biokémiai tanszéken, Analitikai laboratórium, valamint a Központi Laboratóriumban) végeztük el. A méréshez *Beckman* szcintillációs számlálót használtunk, valamint *Packard ULTIMA-Gold* folyadék szcintillációs koktélt.

VIII/2/3. A *cAMP* szerepének *in vitro* vizsgálata a *PBAN* jelátadási folyamatában

Az *in vitro* *PG* inkubációs vizsgálatok sokkal több rész-kísérlet felállítását kívánták meg. Természetesen először itt is elvégeztük a dózis-hatás és idő-hatás vizsgálatokat, amit több farmakológiai jellegű vizsgálat követett az előzőek eredményei alapján. A kísérletekhez a dekapitált nőtényekből származó *PG*-ket 40 µl *Grace* médiumot tartalmazó *Eppendorf* csövekbe helyeztük, melyek tartalmazták a *Hez-PBAN*-t és/vagy farmakokémikáliákat. A

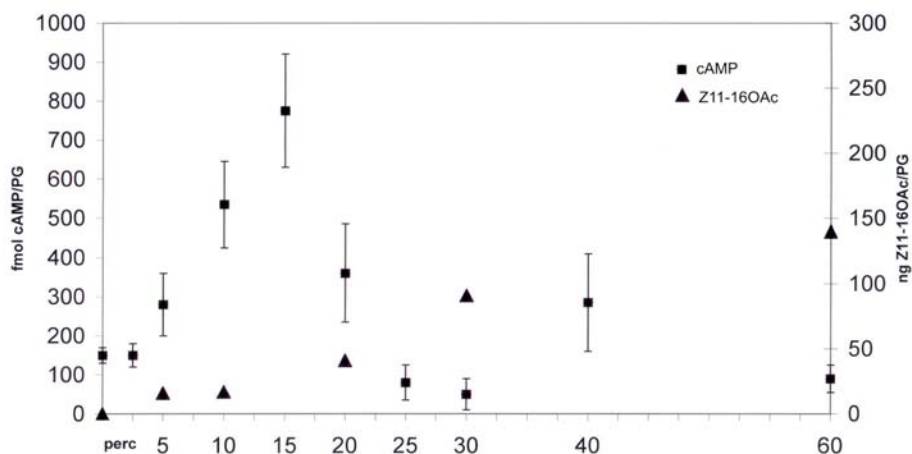
különböző inkubációkat követően értelemeszerűen (rövid inkubációknál nem) elvégeztük a feromon-főkomponens ill. a *cAMP* szintjének méréseit a VIII/2/2. pontban leírtak szerint. A kezeléseket legalább kétszer elvégeztük alkalmanként három ismételtsben.

- a) Az alapvető *Hez-PBAN* dózis-hatás vizsgálatához a korábban is alkalmazott mennyiségeket és módon használtunk. Az idő-hatás vizsgálatok esetében szintén 10 vagy 20 ng-nyit használtunk. A *cAMP* méréseket megelőzendően többféle célzott farmakokemikáliát használtunk korábbi tapasztalatok alapján, így a *Ca ionophore* és *ionomycin* (serkentik a divalens kationok beáramlását), valamint *forskolin* (*AC* aktivátor) hatásait *in vitro* körülmények között. Vizsgáltuk a La^{+++} (LaCl_3), valamint hasonlóképpen a *TFP* (hatékony *CaM* inhibitor) gátlását is *PT/PBAN* –esetünkben *Hez-PBAN* jelenlétében–. A vizsgálatok módszerét tekintve általában korábban leírtak szerint jártunk el (Fónagy és mtsai., 1992b).
- b) A jelátadási folyamat vizsgálatához is –azaz a *cAMP* szintjének méréséhez– a fent nevezett célzott hatású farmakokemikáliát használtunk és a feromon-főkomponens mérések eredményeihez viszonyítva állítottuk be. Először is megvizsgáltuk a *Ca ionophore* és *ionomycin*, valamint *forskolin* hatásait elsősorban rövid inkubációs időket alkalmazva (kezelések részleteit lsd. 39. és 40. ábrákon. Végezetül vizsgáltuk a LaCl_3 gátló hatását *Hez-PBAN* jelenlétében szintén rövid inkubációs időt alkalmazva (2,5-3 perc), ugyanis kontroll körülmények között ekkor tapasztaltuk a legmagasabb *cAMP* szintet (38. ábra). Hasonlóképpen vizsgáltuk továbbá a *TFP* gátlását is több koncentrációban.

VIII/3. Eredmények

VIII/3/1. A *cAMP* szerepének *in vivo* vizsgálata a *PBAN* jelátadási folyamatában

- a) *In vivo* körülmények között **megállapítottuk, hogy egyértelmű dózis-hatás mutatható ki az injektálást követően, de a 10 ill. 20 ng-os kezelések esetében szignifikáns különbség nem mutatkozott a feromon-főkomponensre illetően (128 ± 35 ng ill. 143 ± 29 ng), tehát maximum közeli válasz váltható így ki. Az idő-hatás vizsgálatok esetében a maximális mennyiséget egy óra elteltével mértük (37. ábra).**
- b) A *cAMP* mennyiségi változását és időbeni lefutását a feromon-főkomponens mérések alapján főleg 20 ng-os kezelést követően vizsgáltuk egy órán keresztül. A 37. ábrán jól látható, **hogy a *Hez-PBAN* injektálást követően a 15. percben érte el a maximumot a *cAMP* szintje, míg egy másik kisebb csúcs a 40. perc környékén detektálható.** Ezzel párhuzamosan viszont a feromontemelés maximuma a 60. perc körülre esik folyamatos növekedés eredményeképpen.

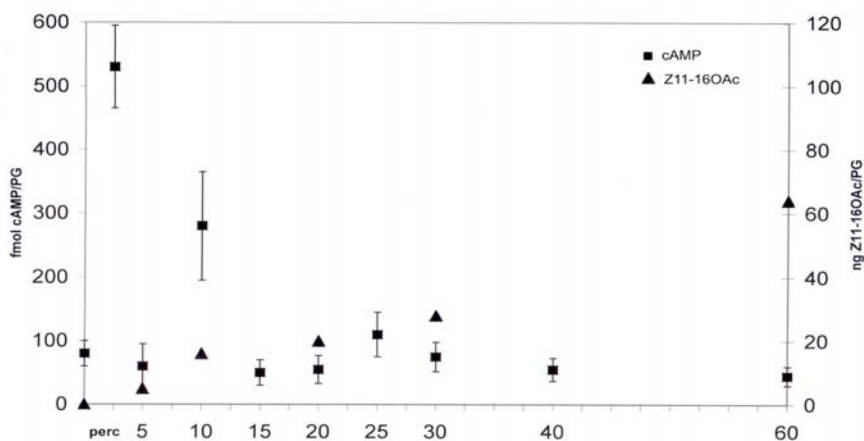


37. ábra: A *cAMP* és Z11-16OAc-tartalom változása *in vivo* *Hez-PBAN* kezelést követően. A számított átlagok legalább 3 független minta eredményéből származnak, a vékony vonalak a \pm SD-t jelölik. (Megj: A feromontartalom esetében a jobb áttekinthetőség kedvéért a szórások nincsenek feltüntetve)

VIII/3/2. A *cAMP* szerepének *in vitro* vizsgálata a *PBAN* jelátadási folyamatában

a) A szintetikus *Hez-PBAN*-nel elvégzett *in vitro* dózis-hatás, valamint idő-hatás vizsgálatok alapvetően az optimális körülmények megállapítását célozták, hogy a jelátadás folyamatát farmakokémikáliákkal vizsgálva, lehető leghatékonyabban elvégezzük.

Körülményeink között a dekapitált nőstényekből eltávolított ***PG*-k *in vitro* kísérletekben (60 perces inkubációt követően) a 20 ng-os kezelésre válaszoltak maximális feromontermeléssel (65 ± 21 ng).** Az időbeni lefutást tekintve egy órán túl nem volt már változás (38. ábra).

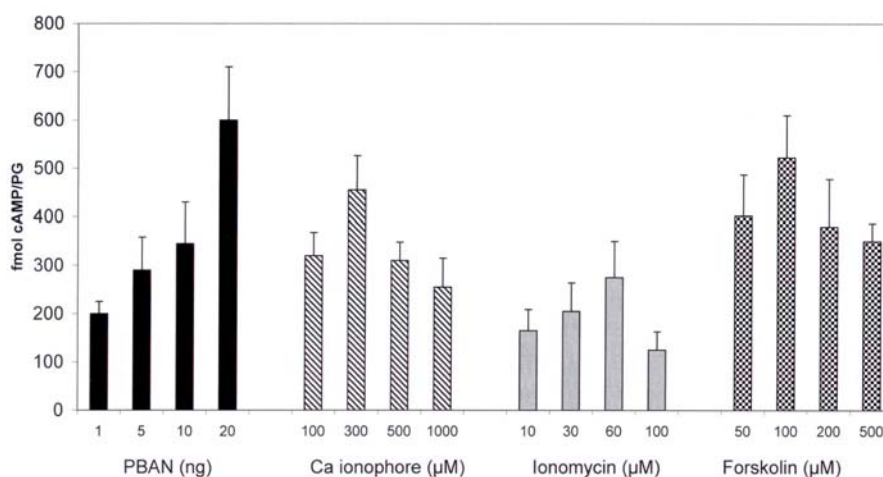


38. ábra: A *cAMP* és Z11-16OAc-tartalom változása *in vitro* *Hez-PBAN* kezelést követően. A számított átlagok legalább 3 független minta eredményéből származnak, a vékony vonalak a \pm SD-t jelölik. (Megj: A feromontartalom esetében a jobb áttekinthetőség kedvéért a szórások nincsenek feltüntetve).

A farmakokémikáliákkal végzett kísérletek esetében a legfontosabb eredmények, hogy mind a *Ca ionophore*, mind pedig az *ionomycin* a leghatékonyabbnak bizonyuló dózisban (300 μ M, ill. 60 μ M) a kontrollhoz képest (20 ng *Hez-PBAN* kezelés) közel 60%-os feromon-termelést tapasztaltunk, míg a *forskolin* (0,1mM) esetében még nagyobb (+70%). A LaCl_3 , valamint a *TFP* (1mM) a *Hez-PBAN*-el (20 ng) együtt inkubálva ellenben jelentősen gátolta a feromontermelést, az előbbi több mint 50%-os, míg az utóbbi mintegy 80%-ot gátlást eredményezve.

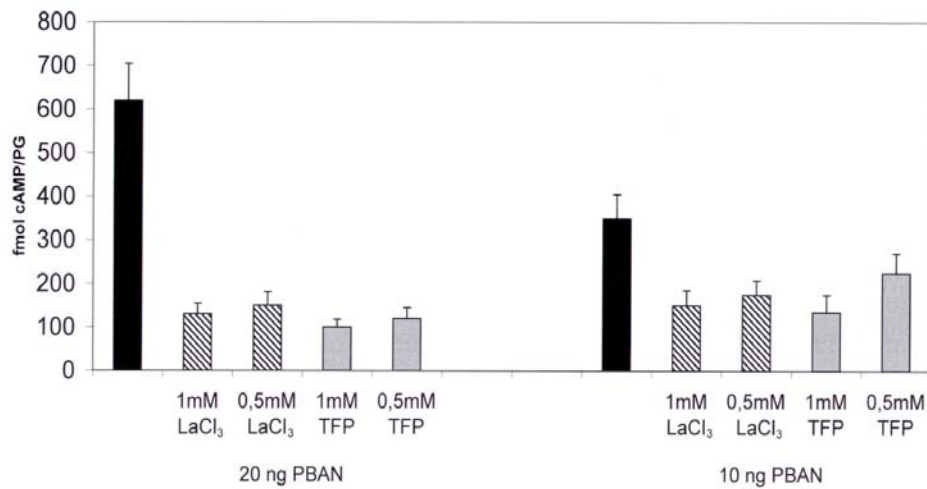
b) A legfigyelemreméltóbb eredményeket ismét a *cAMP* mérések során kaptuk. Ezekben a kísérletekben is a 20 ng-os *Hez-PBAN* kezeléseket alkalmaztuk és egy órán keresztül többször vettünk mintát. Amint az a 38. ábráról jól leolvasható a sűrű mintavételezésnek köszönhetően a *cAMP* szintje a 2-3 percnél volt a legmagasabb, amit két kisebb csúcs követett a 10. majd 25. perc környékén.

A kezeléseket követően a mintákat a fenti tapasztalatok miatt 2,5-3 perc után gyűjtöttük és a 39. ábrán a *Ca ionophore*-ral, *ionomycin*-nel, valamint *forskolin*-nal történő kezelések eredményei láthatók, *Hez-PBAN*-t alkalmazva kontrollként különböző koncentrációkban. A gátlás hatékonyságát (*Hez-PBAN* és LaCl_3 , valamint *TFP*-vel történő együttes inkubáció) a jelátvivő rendszert tekintve pedig a 40. ábrán mutatom be. Az eredmények egyértelműen jól alátámasztják a feromon-főkomponens mennyiségének mért adatait, melyeket egyébként 60 perces inkubációt követve mértünk (legfontosabbakat lsd. fentebb az a). pontnál).



39. ábra: A *cAMP*-tartalom változása *in vitro* *Hez-PBAN*-nel *Ca ionophore*-ral, *ionomycin*-nel, valamint *forskolin*-nal történő kezeléseket követően (2,5-3 perces inkubáció).

Minden esetben 40 μ l Grace médiumot használtunk amelyben a megadott koncentrációban volt jelen a vizsgálandó ágens. A számított átlagok legalább 6 független minta eredményéből származnak, a vékony vonalak a \pm SD-t jelölik.

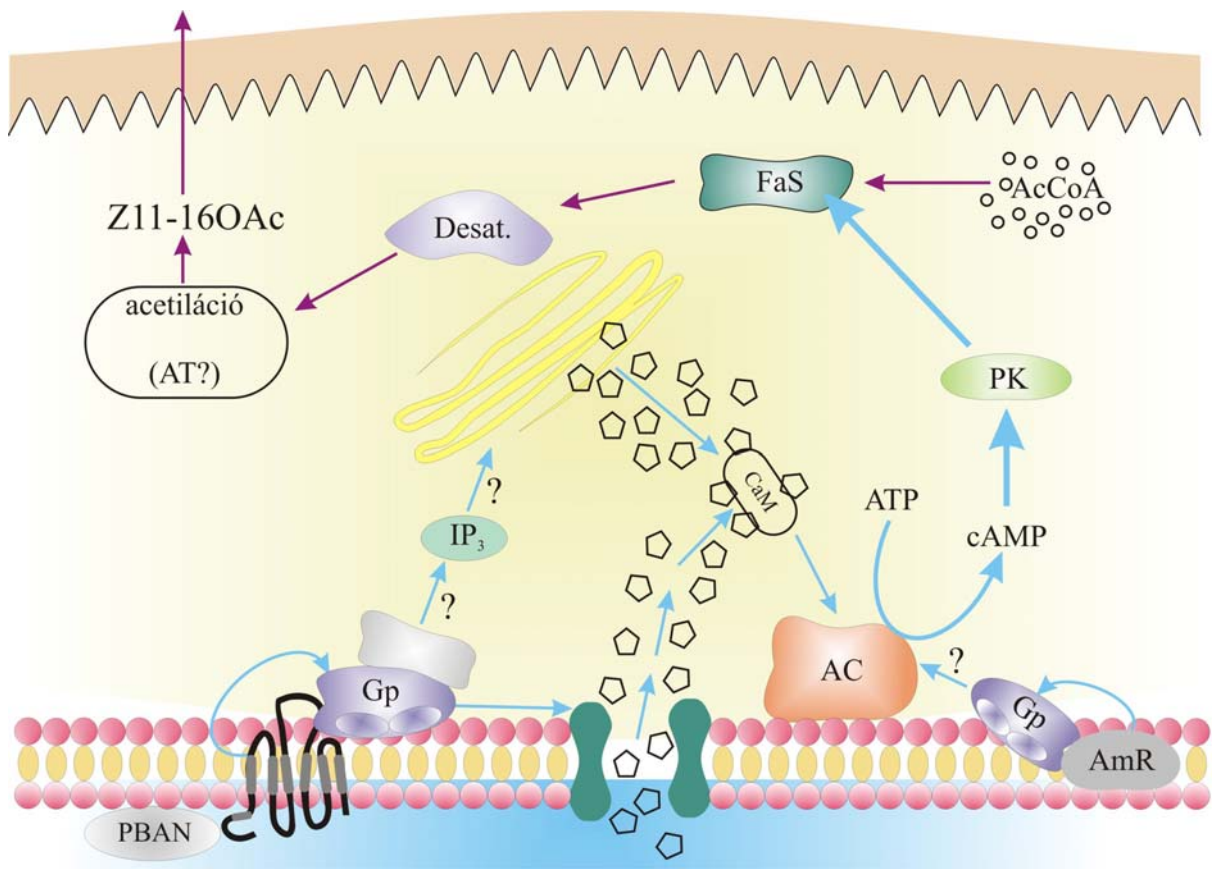


40. ábra: A *cAMP*-tartalom változása *in vitro* *Hez-PBAN*-nel (fekete oszlop), valamint LaCl_3 -dal ill. *TFA*-val és *Hez-PBAN*-el együtt történő kezeléseket követően (2,5-3 perces inkubáció). Minden esetben 40 μl Grace médiumot használtunk amelyben a megadott koncentrációban volt jelen a vizsgálandó ágens. A számított átlagok legalább 6 független minta eredményéből származnak, a vékony vonalak a \pm SD-t jelölik.

VIII/4. Megvitatás

A *M. brassicae* feromontermelésének hormonális irányítottságának vizsgálatánál kiindulásként felhasználtuk azokat az előzményeket, amelyek elsősorban a *Heliothis* fajokra vonatkoztak (Soroker és Rafaeli, 1989; Jurenka és mtsai., 1991b), valamint Bestmann és mtsai. (1989) és Jacquin-Joly és mtsai. (1994) addig közöltek a káposzta bagolylepkére. Tekintettel arra, hogy bizonyosnak tűnt, hogy vagy a Δ -deszturáz szintjén (Bestmann és mtsai. 1989) vagy még valószínűbb, hogy a *Fa*-szintézis előtt fejti ki hatását a *PT/PBAN* a *M. brassicae* PG-ben, ezért indokolt volt a *cAMP* szerepének célzott vizsgálata farmakokémikáliákkal közvetve, ill. *cAMP* mérésén keresztül közvetlenül. Feltételeztük ugyanis, hogy ezeknél a fajoknál a *cAMP* jelátviteli rendszer segítségével indukálódnak *PK*-k, melyek a *Fa*-szintézis enzimmérszletét (*FaS*) aktiválják. A fent említett irodalmakat áttanulmányozva, arra is figyelmesek lettünk, hogy a vizsgálatok elsősorban végtermék, vagy szubsztrát beépülés eredményei alapján következtettek a *cAMP* szerepére, de konkrét mérési adat igen kevés állt rendelkezésünkre. Mint utólag kikövetkeztettük, mivel igen nehéz volt kivitelezni a *cAMP* méréseket (mely mérési lehetőség sajnos a kísérletek során a teljes befejezés előtt meg is szűnt) a szerénynek mondható korábbi eredmények háttérében ez állhatott. Figyelemre méltó ebből a szempontból, hogy Jurenka (1996) áttekintő tanulmányában is részletesebb *cAMP* szint méréseket sürgetett, melyet mi kísérleti fajunkon többé-kevésbé megvalósítottunk, hogy feltevéseinket igazoljuk.

A vizsgálataink eredménye alapján bemutatok egy modell rajzot a *PBAN* hatásmechanizmusára és a feromon-bioszintézisre *M. brassicae*-ben (41. ábra). A javasolt modell, egyébként nagymértékben megegyezik Rafaeli (2002) összefoglalójában –általában *Heliothis* fajokon végzett kísérletek alapján– közöltekkel és rajzoltakkal, viszont ennek egy korábbi, egyszerűsített verzióját már hamarabb bemutatam és ismertettem saját eredményeim alapján (Fónagy, 1999). (Igen sajnálatos, hogy forrás és lehetőség hiányában a vizsgálatokat nem tudtuk befejezni és jelentősebb lapban közölni).



41. ábra: A *PBAN* hatásmechanizmusa és feltételezett jelátadási folyamata (—→), a Z11-16O Ac bioszintézise (—→) a *M. brassicae* PG sejtjeiben. (Részletes magyarázatot lsd. a szövegben).

A fenti nehézségek ellenére a Ca^{++} ionok beáramlásának jelentőségét a jelátviteli rendszerben a *M. brassicae* esetében is sikerült egyértelműen bizonyítanunk azzal, hogy az *in vitro* *Ca ionophore*, valamint *ionomycin* kezelések feromon-bioszintézist serkentették. A divalens kationok beáramlását megakadályozó LaCl_3 viszont, a várakozásnak megfelelően, hatékonyan gátolt. A jelátadási mechanizmusban szerepe van továbbá a *CaM*-nak, mert az *in vitro* vizsgálatokban eredményesen gátolt a *TFP*. Ez esetben azonban valószínűleg nemcsak a

külső beáramló Ca^{++} ionok, hanem a belső rezervoárokból, az IP_3 jelátadó rendszernek köszönhetően további Ca^{++} ionok szabadulnak fel, melyek együttesen serkentik a *CaM*-hoz kötődve a membrán kötött *AC*-t (a jelátadási folyamatot kék nyilak jelölik az ábrán).

Megállapítottuk, hogy a *cAMP* szintje is jelentősen megnőtt a *Ca ionophore* és *ionomycin* kezelések hatására, tehát a csatornák megnyílása, valamint ennek köszönhetően a membrán kötött *AC* aktiválódása bizonyítást nyert. A szintetikus *Hez-PBAN*-nel, ill. LaCl_3 -dal, valamint *TFP*-vel történő együttes kezelést követően nemcsak a feromon-bioszintézis maradt el, hanem a *cAMP* emelkedése. Érdekes továbbá, hogy a *cAMP* szintjének megemelkedése a legszembetűnőbb az *in vitro* kezelést követő néhány percben. *In vivo* kísérletek esetében egy természetes késést tapasztaltunk, hiszen az injektált *PT/PBAN* neuropeptidnek a vérnyirok áramon keresztül el kell jutnia a célszervig.

Az *AC* meghatározó szerepe, valamint a keletkező *cAMP*-nek jelentősége egyértelművé vált a *forskolin* inkubációkat követően. Ekkor ugyanis nemcsak feromontermelést tapasztaltunk, hanem jelentős *cAMP* szint emelkedést is. Emlékeztetésül megjegyzem, hogy a *forskolin* egyáltalán nem serkentette a *B. mori*-ban a feromontermelést (Fónagy és mtsai. 1992a), valamint teljesen hatástalanoknak bizonyultak specifikus *PK* inhibitorok is (Matsumoto és mtsai., 1995). Ezek közül hatástalannak bizonyultak egyes inhibitorok –igaz magas koncentrációban– *H. armigera*-ban (Soroker és Rafaeli, 1995), ill. *H. zea*-ban és *H. virescens*-ben (Jurenka, 1996), míg bizonyos más *PK* inhibitorok ellenben hatékonyak voltak *Heliothis* fajokban, amint arra Rafaeli (2002) összefoglalójában is rámutatott.

A *PK* enzimek a feromon-bioszintézis folyamatának kezdeti szakaszában játszhatnak döntő szerepet (a *de novo* feromon-bioszintézis folyamatát lila nyilak jelölik). Mint ismeretes a *Fa*-szintézist a magasabb rendűeknél ténylegesen egyetlen polipeptid láncba szerveződött enzim együttes végzi. Természetesen a *PG*-kben is a *PK*-k ezt a bizonyos enzim sort (*FaS*) aktiválják, aholis az első lépés során az *AcCoA* karboxiláz az *AcCoA*-t malonil-*CoA*-vá karboxilálja, ami egy irreverzibilis reakció. A lánchosszabodás a 16 szénatomos palmitátig tart. Más esetben úgy vélik, hogy a *Fa*-szintézis kezdeti lépésének beindítása az *AcCoA*-karboxiláz stimulációja a foszfoprotein-foszfátáz rendszeren keresztül valósul meg –mint ahogy az emlős sejtekben kimutatták– defoszforiláció révén (Hardie, 1989; Kim és mtsai., 1989). Elképzelhető tehát, hogy **valójában a szexferomon-bioszintézis *PBAN* általi kulcslépéseinek irányításában és a jelátadási mechanizmusában két fő típus van, amit kísérleteinkkel is bizonyítottunk –azaz *cAMP* általi (pl. *Heliothis*, *Mamestra* fajok) vagy anélküli (pl. *Bombyx*, *Ostrinia* fajok)–, ellenben abban nincs eltérés, hogy egyeseknél foszfátázokat stimulál, másoknál *PK*-kat, ugyanis**

elképzelhető, hogy csak foszfatázok játszanak szerepet (Jurenka, 1996; Rafaeli, 2002). Ez alatt az értendő, hogy ahol a *FaS* áll hormonális irányítás alatt ott az első enzimet, az *AcCoA*-karboxilázt defosz-forilálja, ahol pedig a végső redukciós lépés áll hormonális kontroll alatt ott az *ACR*-t aktiválja defoszforilációval. Ezekre a kérdésekre azonban csak úgy kaphatnánk kielégítő válaszokat, hogyha a szexferomon bioszintézis mozzanatait irányító enzimeket lényegesen jobban ismernénk, valamint olyan vizsgálatokat végeznénk (köztitermék analízis, morfológia stb.), ami hasonló felfogású és volumenű munka lenne mint amelyet a selyemlepkében bemutatam.

A jelátadás folyamatát vizsgálva időnként előfordult, hogy egyes kísérletek kevésbé sikerültek, vagy túl nagy szórást tapasztaltunk szemben a vártnál vagy csupán a *B. mori*-val végzett munkákkal összehasonlítva gondoltuk ezt. Ezért mindenképpen fontosnak tartom megjegyezni, hogy kísérleteink lezárását követően közzétették Iglesias és mtsai. (1998), hogy arra a következtetésre jutottak, hogy mind a *S. litura*-ban mind pedig a *M. brassicae*-ben a humorális irányítás mellett szükséges az ép hasi ideg is és az utolsó hasi dúc. Érdekes módon korábban Jacquin-Joly és mtsai. (1994) ennek ellenkezőjét állították és kísérleteink során ezt vettük alapul. Ezek a következtetések azonban többféleképpen is értékelhetők, hiszen lehet, hogy a *PG* az autonóm módon működik és működtethető, mint célszerv, ellenben a *PBAN* kétféle úton juthat el: gyorsabban (a vérnyirokon keresztül) vagy lassabban (idegen szállítódva és célszerv közelében ürülve), tehát szorosan véve a serkentetőségnek nem feltétele az intakt környezet. Több szerző is állítja –mely nézőponthoz én is csatlakozom–, hogy a kísérleti körülményeknek, a boncolásnak, *in vitro* beállításoknak mindenképpen meghatározó szerepük van és bizony néha kockázatos kissé eltérő kísérleteket összehasonlítani, mert standardizált körülményeket és jó reprodukálhatóságot elsősorban legalább egy laboron belül (egy fajon) célszerű megvalósítani. Még ilyen körülmények között is bizony születhetnek értékelhetetlen és érthetetlen eredmények, melyeket több ismétléssel ki lehet szűrni, és óvakodni kell a téves következtetésektől.

IX. KITEKINTÉS

Az első –mint utóbb kiderült igen általánosan előforduló– rovar-neuropeptidet, a *proktolint* (Starratt és Brown, 1975) hamarosan követett az első „igazi” rovar specifikus hormonsorozat felfedezése, a lipid háztartásért és energia felhasználásért felelős AKH-é (Stone és mtsai., 1976). Mint azt az **IRODALMI ÁTTEKINTÉS** fejezetben összefoglaltam robbanásszerűen követték egymást az izolációs és szerkezet-meghatározások és nyomban megkezdődtek az általánosabb (pl: *proktolin*) (Konopińska és mtsai., 1986) majd specifikusabb neuropeptidek mint pl. az *AKH*, a *PK*-típusú, a *TMOF*, vagy az *AST*-k különböző szintetikus analógjainak/ mimetikumoknak racionális (az ismert és biológiailag aktív neuropeptid térszerkezetét optimálisan követő) tervezése, szintetizálása és sorozatvizsgálata, amint azt Gäde és Goldsworthy (2003) nemrég összefoglalták és ezt a –gyakorlat szempontjából igen fontos– témát a közelműtben két rövidebb tanulmányomban én is feldolgoztam (Fónagy, 2006b,c). Alapkövetelmény, hogy az aminosav szekvencia meghatározásán túl szintetikus peptidek/ szakaszok segítségével kivizsgálható az aktív régió, ill. az aktivitáshoz szükséges minimális szekvencia, lehetőség szerint *in vivo* és *in vitro* tesztekben is. Napjainkban a feltételezett háromdimenziós térszerkezet megállapítására is bőven van már lehetőség, ami szintén segíti a hatékony molekulatervezést. Szükséges azonban, hogy a gyakorlati célú mimetikumok hő- és fénystabilak legyenek, a kutikulán és/vagy a bél hámsejtjein akadálytalanul átjuthassanak, endopeptidázokkal szemben ellenállóak legyenek (vagy az aktivitást nem befolyásoló „védelemmel” legyenek ellátva, vagy pedig ne alapvetően peptid természetű molekula legyen, hanem ún. *pseudopeptid*). Ezeket a gyakorlati célú kutatásokat a megfelelő fejezetek **Megvitatásaiban** röviden ismertettem is.

Használatos egy másik szélesebb körű új fogalom is az ún. „*drugable*” kifejezés, ami ugyan a gyógyszerteremtésből származik, de estünkben rovarok ellen felhasználható olyan számítógépes szimulációval tervezett virtuális molekulát jelent, melyek elektrosztatikusan és alakilag megfelelő, továbbá nem oldhatatlan óriásmolekula, vagy illékony kismolekula, a szervezetben jól felszívódik és várhatóan nem toxikus. Megemlítendő, hogy a modern inszekticid kutatásnak az ún. természetes eredetű biológiailag aktív anyagok közvetlen (klf. növényi kivonatok, vírusok, baktériumok élettani, toxikológiai hatásai célszervezeteken), ill. közvetett (hatékonyak talált vegyületek, komponensek mimetikumainak, analógjainak tervezése, előállítás) vizsgálata már külön tudományterület (Ujváry, 2006). Ezek az anyagok nem peptidtermészetűek, ellenben endokrin hatásuk lehet, ezért szerepük és jelentőségük semmiképp sem elhanyagolható.

A rovar-neuropeptidek és az általuk irányított folyamatok ismerete újfajta megközelítést tett és

teszt lehetővé mind a biológiai megismerés, mind pedig ezen folyamatok lehetséges befolyásolásának területén. A peptidek jellemzésén és a szerkezet-hatás vizsgálatokon keresztül a molekuláris genetika, prekursorok azonosítása, bioszintézis, receptorok és a neuropeptidek kapcsolódása, majd a degradáció területeire hatolhatunk be. Ezen módszerek „összegyűrése” – a biológiai hatásvizsgálatoktól a molekuláris biológiáig – kivételes lehetőségeket nyújtanak arra, hogy a jövőben hatékony, könnyen kezelhető, specifikus védekezést dolgozzunk ki a rovarkártevők ellen.

Mint tudjuk a peptidek közvetlen alkalmazásának sok akadálya van, de ezen molekulákba rejtett információ szinte korlátlan lehetőséget nyújt a rovarfiziológiai megismerés és a specifikus kontroll területén, amit azt Menn és mtsai. (1991) által szerkesztett korai, ilyen irányú könyv is tárgyalt. Az alább vázolt perspektívák általánosnak tekinthetők a rovar neuroendokrinológia területén:

- A neurohormonok szintézisének területén számos beavatkozási pont van. A peptid érését specifikus enzimek irányítják. A gén expresszió, ill. a specifikus enzimek gátlásával a hormon szintézis akadályozható meg.
- A peptidek kiürülését *releasing* faktorok (peptidek, aminosavak stb.) befolyásolhatják, melyek preszinaptikusan a peptiderg neuron idegvégződéseire hathatnak. Szintetikus vegyületek, melyek hatással vannak hormonkiürülésre komoly szerepet játszhatnak a későbbiekben.
- A neuropeptid receptorok – főleg miután egyre több kerül meghatározásra – szintén támadási területet jelenthetnek. A receptor kötődési próbák fejlesztésével (melynek alapfeltételei, hogy minél több hormont és annak pontos célszervét, célsejtjét ismerjünk) remény nyílik olyan szintetikus peptidek vizsgálatára, melyek elvezethetnek a receptor-szintű antagonistához, agonistához. A szerkezet-hatás vizsgálatok nyújtják a legtöbb információt a célzott mimetikum fejlesztéshez. Ezek a módszerek a gerinces farmakológiában mindennaposak, és a gyógyszertervezés/-kutatás alapjait képezik.
- A fiziológiai válasz kiváltásában olyan „inszekticid” hatás is elképzelhető, mely a másodlagos hírvívó rendszer bekapcsolása (nem receptor szintű hamis hormonhatás) útján valósul meg.
- A neuropeptidek degradációjában résztvevő enzimek, azaz az aminoszintázok működésének gátlása hiperstimulációt eredményezhet, mely mindenképpen viselkedési és/ vagy homeosztatikus egyensúlybomláshoz vezet.

Kutatásaimmal és az eredmények ismertetésével példát szerettem volna nyújtani arra vonatkozólag is, hogy a rovarbiokémiai és rovarélettani ismeretek mennyire nélkülözhetetlenek a későbbi, környezetkímélő, növényvédelmi indíttatású kémiai és/vagy biotechnológiai úton történő beavatkozásokhoz. **A mindenkori, valamint későbbi gyakorlat tehát semmiképpen sem nélkülözheti az alapkutatás segítségével megszerzett ismereteket és tudást.**

X. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom elsősorban azon külföldi laboratóriumok kutató és segédszemélyzetének, valamint vezetőiknek, nevezetesen Dr. Shogo Matsumoto-nak (RIKEN, Wako-shi, Japán) ahol munkáim nagyrészt elvégezhettem, ill. együttműködő partnereimnek Dr. Peter Teal-nek (USDA, ARS, Gainesville, Florida, U.S.A) és Prof. Dr. Gerd Gäde-nak. Köszönet illeti a JSPS-t (Japán állami meghívásos kutatási ösztöndíj szervezet), mely több alkalommal biztosított számomra ösztöndíjat rövidebb-hosszabb időkre, valamint a RIKEN International Co-operation pályázati rendszerét, továbbá a MAKÁ (Amerikai-Magyar) JFNo: 93/356 és a TÉT Alapítvány DAK:1/2000 (Dél-Afrika-Magyarország) számú együttműködési pályázatokat. Köszönetet nyilvánítok munkahelyemnek, az MTA Növényvédelmi Kutatóintézetének is.

Munkahelyemen és más intézményekben, valamint egyetemeken számos kollégának, embernek, ismerősnek tartozom hálával segítségükért, tanácsaikért, önzetlen támogatásukért, akiket az alábbiakban névsorban tüntetek fel:

Dr. Balázs Klári, Dr. Basky Zsuzsa, Dr. Bakonyi Gábor, Dr. Bartha Emília, Dr. Csernus Valér, Dr. Darvas Béla, Dr. Fekete Gábor, Gomola Isvänné (Annuska), Dr. Jermy Tibor, Kárpáti Zsolt, Kincsesné Gyurkovics Judit, Konczné Benedicty Zsuzsa, Kovács Gyuláné (Gabika), Dr. Kozár Ferenc, Körmendy Cecília, Nágli Pálné (Erzsi) Nyiri Gyuláné (Gyöngyi), Dr. Papp László, Dr. Székács András, Dr. Szőcs Gábor (akit nagy köszönet illet dolgozatom első átolvasásáért és javaslataiért), Dr. Tóth Miklós, valamint Dr. Varjas László.

Szüleimnek, valamint családomnak külön hálával és köszönettel tartozom, akik mindvégig elviselték hiányomat sok megpróbáltatással járó külföldi (kiemelendő gyakran a nagy távolságokat), vagy hazai munkáim során és mindvégig kitartottak mellettem, biztattak és támogattak. Türelmét és megértését köszönöm két fiamnak Bálintnak és Andrisnak, valamint végül, de nem utolsósorban, megkülönböztetett köszönet férjemnek, Nagy Z. Lászlónak, aki nélkül e dolgozat nem születhetett volna meg ilyen formában.

XI. IRODALOM

- Aas, M. (1971): Organ and distribution of fatty acid activating enzymes in the rat. *Biochim. Biophys. Acta.* 231: 32-47.
- Adams, J. (1990): Charge-remote fragmentations: analytical applications and fundamental studies. *Mass Spec. Rev.* 9: 141-186.
- Altstein, M., Harel, M. és Dunkelblum, E. (1989): Effect of a neuroendocrine factor on sex pheromone biosynthesis in the tomato looper, *Chrysodeixis chalcites* (Lepidoptera: Noctuidae). *Insect Biochem.* 19: 645-649.
- Altstein, M., Gazit, Y. és Dunkelblum, E. (1993): Neuroendocrine control of sex pheromone biosynthesis in *Heliothis peltigera*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 22: 153-168.
- Altstein, M., Ben-Aziz, O., Scheffler, I., Zeltser, I. és Gilon, C. (2000): Advances in the application of neuropeptides in insect control. *Crop Prot.* 19: 547-555.
- Ando, T., Hase, R., Arima, R. és Uchiyama, M. (1988): Biosynthetic pathway of bombykol, the sex pheromone of the female silkworm moth. *Agric. Biol. Chem.*, 52: 473-478.
- Arima, R., Takahara, K., Kadoshima, T., Numazaki, F., Ando, T., Uchiyama, M., Nagasawa, Kitamura, A. és Suzuki, A. (1991): Hormonal regulation of pheromone biosynthesis in the silkworm moth, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). *Appl. Entomol. Zool.* 26: 137-147.
- Arn, H., Tóth, M. és Priesner, E. (1992): List of sex pheromones of Lepidoptera and related attractants. 2nd edition, Organization Internationale de Lutte Biologique, Section Régionale Ouest Paléarctique, Montfavet, France.
- Arn, H., Tóth, M. és Priesner, E. (1999): The Pherolist. <http://www.nysaes.cornell.edu/pheronet/>.
- Asahina, M., Fugo, H. és Takeda, S. (1994): Ecdysteroid synthesis in dissociated cells of the prothoracic gland of the silkworm, *Bombyx mori*. *Zool. Sci.* 11: 107-111.
- Asher, C., Moshitzky, P., Ramachandran, J., Applebaum, S.W. (1984): The effects of synthetic locust adipokinetic hormone on dispersed locust fat body cell preparations. *Gen. Comp. Endocrinol.* 55: 167-173.
- Attygalle, A.B., Herrig, M., Vostrowsky, O. és Bestmann, H.J. (1987): Techniques for injecting intact glands for analysis of sex pheromones of Lepidoptera by capillary gas chromatography: reinvestigation of pheromone complex of *Mamestra brassicae*. *J. Chem. Ecol.* 13: 1299-1311.
- Audsley, N. és Weaver, R. (2003): A comparison of the neuropeptides from the retrocerebral complex of adult male and female *Manduca sexta* using MALDI-TOF mass spectrometry. *Regul. Peptides.* 116: 127-137.
- Babu, Y.S., Sack, J.S., Greenhough, T.J., Bugg, C.E., Means, A.R. és Cook, W.J. (1985): Three-dimensional structure of calmodulin. *Nature.* 315: 37-40.

- Beenackers, A.M.T. (1969): The influence of corpus allatum and corpus cardiacum on lipid metabolism in *Locusta migratoria*. Gen. Comp. Endocrinol. 13 (Abstr. Vol.): 492.
- Bestmann, H.J., Herrig, M. és Attygalle, A.B. (1987): Terminal acetylation in pheromone biosynthesis by *Mamestra brassicae* L. (Lepidoptera: Noctuidae). Experientia. 43: 1033-1034.
- Bestmann, H.J., Herrig, M., Attygalle, A.B. és Hupe, M. (1989): Regulatory steps in sex pheromone biosynthesis in *Mamestra brassicae* L. (Lepidoptera: Noctuidae). Experientia. 45: 778-781.
- Birgül, N., Weise, C., Kreienkamp, H.-J. és Richter, D. (1999): Reverse physiology in *Drosophila*: identification of a novel allatostatin-like neuropeptide and its cognate receptor structurally related to the mammalian somatostatin/galanin/opioid receptor family. EMBO J. 18: 5892-5900.
- Bjostad, L.B. és Roelofs, W.L. (1986): Sex pheromone biosynthesis in the red-banded leafroller moth, studied by mass-labeling with stable isotopes and analysis with mass spectrometry. J. Chem. Ecol. 12: 431-450.
- Bjostad, L.B., Wolf, W.A. és Roelofs, W.L. (1987): Pheromone biosynthesis in lepidopterans: Desaturation and chain shortening. In: Prestwich, G.D., Blomquist, G.J. (Eds.) Pheromone Biochemistry, Academic Press, Orlando, Fl. 77-120.
- Blackburn, M.B., Wagner, R.M., Kochansky, J.P., Harisson, D.J., Thomas-Laemont, P. és Raina, A.K. (1995a): The identification of two inhibitory peptides, with sequence similarities to the galanins, isolated from the ventral nerve cord of *Manduca sexta*. Regul. Pept. 57: 213-219.
- Blackburn, M.B., Wagner, R.M., Shabanowitz, J., Kochansky, J.P., Hunt, D.F., és Raina, A.K. (1995b): The isolation and identification of three diuretic kinins from the abdominal ventral nerve cord of *Helicoverpa zea*. J. Insect Physiol. 41: 723-730.
- Blomquist, G.J. és Vogt, R.G. (Eds.) (2003): Insect pheromone biochemistry and molecular biology. Elsevier, Academic Press, San Diego, Ca. pp: 1-745.
- Blum, M.S. (1985): Exocrine systems. In: Blum, M.S. (Ed.) Fundamentals of Insect Physiology, John Wiley and Sons, New York. 535-579.
- Bodnaryk, R.P. és Morishima, L. (1984): Isolation and characterization of a calmodulin lacking trimethyllysine from the fat body of the silkworm, *Bombyx mori*. Insect. Biochem. 14: 11-7.
- Bollenbacher, W.E., O'Brian, M.A., Katahira, E.J. és Gilbert, L.I. (1983): A kinetic analysis of the action of the prothoracicotropic hormone. Molec. Cell Endocrinol. 32: 27-46.
- Borel, J.F., Feurer, C., Magnee, C. és Stahelin, H. (1977): Effects of the new anti-lymphocytic - peptide cyclosporine A in animals. Immunology. 32: 1017-1025.
- Brockerhoff, H. (1975): Determination of the positional distribution of fatty acids in glycerolipids. In: Lowenstein, J. M. (Ed.) Methods in Enzymology. Academic Press, New York. 35: 315-325.

Butenandt, A., Beckmann, R., Stamm, D. és Hecker, E. (1959): Über den Sexuallockstoff des Seidenspinners *Bombyx mori*. Reindarstellung und Konstitution. Z. Naturforsch. 14b: 283-384.

Butenandt, A. és Karlson, P. (1954): Über die Isolierung eines Metamorphose-Hormons der Insekten in kristallisierter Form. Z. Naturforsch. 9b: 389-391.

Bylemans, D., Borovsky, D., Hunt, D.F., Shabanowitz, J., Grauwels, L. és De Loof, A. (1994): Sequencing and characterization of trypsin modulating oostatic factor (TMOF) from ovaries of the grey fleshfly *Neobellieria (Sarcophaga) bullata*. Reg. Pept. 50: 61-72.

Cardé, R.T. és Webster, R.P. (1980): Endogenous and exogenous factors controlling insect sex pheromone production and responsiveness, particularly among Lepidoptera. In: Regulation of Insect Development and Behavior. Karpacz, Wrocław Tech. Univ. Press. 991-997.

Chang, M.M., Leeman, S.E. és Niall, H.D (1971): Amino acid sequence of substance P. Nature. 232: 86-87.

Cheung, W.Y. (1980): Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation. Science. 207: 19-27.

Choi, M.-Y., Fuerst, E.-J., Rafaeli, A. és Jurenka, R. (2003): Identification of a G protein-coupled receptor for pheromone biosynthesis activating neuropeptide from pheromone glands of the moth *Helicoverpa zea*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100: 9721-9726.

Choi, M.-Y., Tanaka, M., Kataoka, H., Boo, K.S. és Tatsuki, S. (1998) Isolation and identification of the cDNA encoding the pheromone biosynthesis activating neuropeptide and additional neuropeptides in the oriental tobacco budworm, *Helicoverpa assulta* (Lepidoptera: Noctuidae). Insect Biochem. Mol. Biol. 28: 759-766.

Christensen, T.A., Itagaki, H., Teal, P.E., Jasensky, R.D., Tumlinson, J.M. és Hildebrand, J.G. (1991): Innervation and neural regulation of sex pheromone gland in female *Heliothis* moths. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88: 4971-4975.

Clifford, G.M., Londos, C., Kraemert, F.B., Vernon, R.G. és Yeaman, S.J.(2000): Translocation of hormone-sensitive lipase and perilipin upon lipolytic stimulation and rat adipocytes. J. Biol. Chem. 275: 5011-5015.

Coast, G.M. (1998): Insect diuretic peptides: Structures, evolution and actions. Amer. Zool. 38: 442-449.

Coast, G.M., Holman, G.M. és Nachman, R.J. (1990): The diuretic activity of a series of cephalomyotropic neuropeptides, the achetakinins on isolated Malpighian tubules of the house cricket, *Acheta domesticus*. J. Insect Physiol. 36: 481-488.

Cohen, P. (1989): The structure and regulation of protein phosphatases. Annu. Rev. Biochem. 58: 453-508.

Cook, B.J. és Holman, G.M. (1985): Peptides and kinins. In: Kerkut, G.A és Gilbert, L.I. (Eds). Comprehensive Insect Physiology and Pharmacology. Pergamon Press, Oxford.

- Cook, B.J. és Holman, G.M. (1978): Comparative pharmacological properties of muscle functions in the foregut and the hindgut of the cockroach *Leucophaea maderae*. Comp. Biochem. Physiol. 61C: 291-295.
- Cusinato, O., Drake, A.F., Gäde, G. and Goldsworthy, G.J. (1998): The molecular conformations of representative arthropod adipokinetic peptides determined by circular dichroism spectroscopy. Insect Biochem. Mol. Biol. 28: 43-50.
- Cusson, M. és Mc Neil, J.N. (1989): Involvement of juvenile hormone in the regulation of pheromone release activities in a moth. Science. 243: 210-212.
- Davis, M.B., Vakharia, V.N., Henry, J., Kempe, T.G. és Raina, A.K. (1992): Molecular cloning of the pheromone biosynthesis activating neuropeptide in *Helicoverpa zea*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89: 142-146.
- De Loof, A., Baggerman, G., Breuer, M., Claeys, I., Cerstiaens, A., Clynen, E., Janssen, T., Schoofs, L. és Van den Broeck, J. (2001): Gonadotropins in insects: An overview. Arch. Insect Biochem. Physiol. 47: 129-138.
- Diederer, J.H.B., Peppelenbosch, M.P., Vullings, H.C.B. (1992): Ageing adipokinetic cells in *Locusta migratoria*: an ultrastructural morphometric study. Cell Tissue Res. 268: 117-121.
- Downer, R. G. H. és Laufer, H. (eds.) (1983): Endocrinology of insects; Invertebrate endocrinology. Vol. 1. Alan R. Liss Inc., New York. pp: 1-707.
- Duportets, L., Gadenne, C. és Couillaud, F. (1999): A cDNA, from *Agrotis ipsilon*, that encodes the pheromone biosynthesis activating neuropeptide (PBAN) and other FXPRL peptides. Peptides. 20: 899-905.
- Egan, J., Greenberg, A., Chang, M-K., Wek, S.A., Moos, M.C. és Londos, C. (1992): Mechanism of hormone-stimulated lipolysis in adipocytes: Translocation of hormone-sensitive lipase to the lipid storage droplet. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89: 8537-8541.
- Endo, A., Kuroda, M. és Tanzawa, K. (1976): Competitive inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by ML-236A and ML-236B fungal metabolites, having hypocholesterolemic activity. FEBS Lett. 72: 323-326.
- Fabrias, G., Jurenka, R.A. és Roelofs, W.L. (1992): Stimulation of sex pheromone production by proteinaceous extracts of the bursa copulatrix on the redbanded leafroller moth. Arch. Insect Biochem. Physiol. 20: 75-86.
- Fang, N., Teal, P.E.A. és Tumlinson, J.H. (1995): Correlation between glycerolipids and pheromone aldehydes in the sex pheromone gland of female tobacco hornworm moths, *Manduca sexta* (L.). Arch. Insect Biochem. Physiol. 30: 321-336.
- Fónagy, A. (1994): Új miotropikus és feromonotropikus rovar neuropeptidok izolálása, meghatározása és biológiai aktivitása; Egyéb kapcsolódó peptidok hatásmechanizmusa különböző rovarbiológiai vizsgálati rendszerekben. MTA Kand. Ért. pp: 1-78+mellk.

- Fónagy, A. (1999): A PBAN (Pheromone Biosynthesis Activating Neuropeptide) hatásmechanizmusa lepkékben. In: Sáringer, Gy., Balázs, K. és Szemessy Á (Eds.) Növényvédelmi Tudományos Napok '99 Budapest, Reprint Kft. Budapest. Abs. Vol. p: 47.
- Fónagy, A. (2005): Betekintés a rovar-neuroendokrinológiába. I. A neuropeptidok szintézise, hatásai, csoportosításuk. Biokémia. 29: 60-67.
- Fónagy, A. (2006a): A rovarok legfontosabb ritmikus életfolyamatai és azok hormonális háttere. In: Biológiai órák. Ritmikus biológiai folyamatok az élővilágban eds: Csernus V. és Mess B. Akadémiai Kiadó, Budapest pp. 37-62.
- Fónagy, A. (2006b): Betekintés a rovar-neuroendokrinológiába. II. A neuropeptidok receptorai, hatásmechanizmusuk, valamint ezen ismeretek gyakorlati alkalmazhatósága. Biokémia. 30: 7-14.
- Fónagy, A. (2006c): Insect neuropeptides and their potential application for pest control. Acta Phytopathol. Entomol. Hung. 41: 137-152.
- Fónagy, A., Marco, H. és Gäde, G. (2002): Myotropic and metabolic neuropeptides from the pest species, *Mamestra brassicae* (Noctuidae, Lepidoptera). 21st Conf. of Eur. Comp. Endocrinologists, Bonn, 26-31 Aug. Abs. Vol. p.101.
- Fónagy és mtsai., (2007): Some recent findings and neuropeptide identifications in the pest species, *Mamestra brassicae* (Noctuidae; Lepidoptera). (in prep.)
- Fónagy, A., Matsumoto, S., Uchiumi, K. és Mitsui, T. (1992a): Role of calcium ion and cyclic nucleotides in pheromone production in *Bombyx mori*. J. Pestic. Sci. 17: 115-121.
- Fónagy, A., Matsumoto, S., Uchiumi, K., Orikasa, C. és Mitsui, T. (1992b): Action of pheromone biosynthesis activating neuropeptide on pheromone glands of *Bombyx mori* and *Spodoptera litura*. J. Pestic. Sci. 17: 47-54.
- Fónagy, A., Ohnishi, A., Esumi, Y., Suzuki, Y. és Matsumoto, S. (2005): Further studies of lipid droplets in the bombykol producing pheromone gland of *Bombyx mori*. In: Vaudry, H., Schoofs, L., Flick, G. és Larhammar, D. (Eds.) Trends in Comparative Endocrinology and Neurobiology Annals New York Acad. Sci. 1040: 310-314.
- Fónagy, A., Schoofs, L., Matsumoto, S., De Loof A. és Mitsui, T. (1992c): Functional cross reactivities of some locustamyotropins and *Bombyx* pheromone biosynthesis activating neuropeptide. J. Insect Physiol. 38: 651-657.
- Fónagy, A., Schoofs, L., Proost, P., Van Damme, J. és De Loof, A. (1992d): Isolation and primary structure of two sulfakinin-like peptides from the fleshfly, *Neobellieria bullata*. Comp. Biochem. Physiol. 103C: 135-142.
- Fónagy, A., Schoofs, L., Proost, P., Van Damme, J., Bueds, H. és A. De Loof, A (1992e): Isolation, primary structure and synthesis of neomyosuppressin, a myoinhibiting neuropeptide from the grey fleshfly, *Neobellieria bullata*. Comp. Biochem. Physiol., 102C: 239-245.
- Fónagy, A., Yokoyama, N., Okano, K., Ozawa, R., Tatsuki, S., Maeda, S. és Matsumoto, S. (1999): Involvement of Calcineurin in the signal transduction of PBAN in the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera). Comp. Biochem. Physiol. 124B: 51-60.

- Fónagy, A., Yokoyama, N., Okano, K., Tatsuki, S., Maeda, S. és Matsumoto, S. (2000): Pheromone-producing cells in the silkmoth, *Bombyx mori*: identification and their morphological changes in response to pheromonotropic stimuli. *J. Insect Physiol.* 46: 735-744.
- Fónagy, A., Yokoyama, N. és Matsumoto, S. (2001): Physiological status and change of cytoplasmic lipid droplets in the pheromone-producing cells of the silkmoth, *Bombyx mori* (Lepidoptera, Bombycidae). *Arthr. Struct. Dev.* 30: 113-123.
- Fónagy, A., Teal, P., Meredith, J., Körmendy, C. és Tumlinson, J. (1996): The purification, isolation and partial identification of a new pheromonotropic peptide from the moth *Mamestra brassicae* (Lepidoptera). *Annales d'Endocrinol.* Vol 57: 18th Conf. of Eur. Comp. Endocrinol., Rouen, Abs. Vol: C18.
- Fónagy, A., Teal, P., Meredith, J., Körmendy, C. és Tumlinson, J. (1998): Partial identification of a new pheromonotropic peptide from *Mamestra brassicae*. In: Vaudry, H., Tonon, M-C., Roubos, E. és De Loof, A. (Eds). *Trends in Comparative Endocrinology and Neurobiology.* Annals New York Acad. Sci. 839: 488-490.
- Foster, S.P. (2001): Fatty acyl pheromone analogue-containing lipids and their roles in sex pheromone biosynthesis in the lightbrown apple moth *Epiphyas postvittana* (Walker) *J. Insect Physiol.* 47: 433-443.
- Foster, S.F. (2005): Lipid analysis of the sex pheromone gland of the moth *Heliothis virescens*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 59: 80-90.
- Fox, A.M. és Reynolds, S.E. (1991): Degradation of adipokinetic hormone family peptides by a circulating endopeptidase in the insect *Manduca sexta*. *Peptides.* 12: 937-944.
- Fraenkel, G. (1935): Hormone causing pupation in the blowfly *Calliphora erythrocephala*. *Proc. R. Lond. Ser. B.* 1953: 1-12.
- Gäde, G. (1985): Isolation of hypertrehalosaemic factors I and II from the corpus cardiacum of the Indian stick insect, *Carausius morosus*, by reversed-phase high performance liquid chromatography and amino acid composition of factor II. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.* 366: 195-199.
- Gäde, G. (1990): Structure-function studies on hypertrehalosemic and adipokinetic hormones: activity of naturally occurring analogues and some N- and C-terminal modified analogues. *Physiol. Ent.* 15: 299-316.
- Gäde, G. (1997): The explosion of structural information on insect neuropeptides. In: Herz, W., Kirby, G. W., Moore, R. E., Steglich, W. és Tamm, C. (Eds.). *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, Springer, Wien, New York. pp:1-128.
- Gäde, G. (2004): Regulation of intermediary metabolism and water balance of insects by neuropeptides. *Annu. Rev. Entomol.* 49: 93-113.
- Gäde, G. és Auerswald, L. (2003): Mode of action of neuropeptides from the adipokinetic hormone family. *Gen. Comp. Endocrinol.* 132: 10-20.

- Gäde, G. és Goldsworthy, G. (2003) Insect peptide hormones: a selective review of their physiology and potential application for pest control. *Pest Manag. Sci.* 59: 1063-1075.
- Gäde, G. és Hoffmann, K-H. (2005): Neuropeptides regulating development and reproduction in insects. *Physiol. Entomol.* 30: 103-121.
- Gäde, G., Hoffmann, K-H. és Spring, J. H. (1997): Hormonal regulation in insects: Facts, gaps, and future directions. *Physiol. Rev.* 77: 963-1032.
- Gazit, Y., Dunkelblum, E., Ben-Aziz, C. és Altstein, M. (1992): Immunochemical and biological analysis of pheromone biosynthesis activating neuropeptide in *Heliothis peltigera*. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* 19: 247-260.
- Gilon, C., Halle, D., Chorev, M., Selinger, Z. és Byk, G. (1991): Backbone cyclization: a new method for conferring conformational constraint on peptides. *Biopolymers.* 31: 745-750.
- Gross, E. (1967): The cyanogens bromide reaction. *Methods Enzymol.* 11: 238-255.
- Greenspan, P. Meyer, E.P. és Fowler, S.D. (1985): Nile Red: a selective stain for intracellular oil droplets. *J. Cell Biol.* 100: 965-973.
- Gu, S.-H., Chow, Y.-S. és Yin, C-H. (1997): Involvement of juvenile hormone in regulation of prothoracicotropic hormone transduction during the early last larval instar of *Bombyx mori*. *Mol. Cell. Endocrinol.* 127: 109-116.
- Guerini, D., Montell, C. és Klee, C.B. (1992): Molecular cloning and characterization of the genes encoding the two subunits of *Drosophila melanogaster* calcineurin. *J. Biol. Chem.* 267: 22542-22549.
- Hardie, D.G. (1989): Regulation of fatty acid synthesis via phosphorylation of acetyl-CoA carboxylase. *Prog. Lipid Res.* 28: 117-146.
- Hashimoto, T. (1996): Peroxisomal beta-oxidation: enzymology and molecular biology. *Annals New York Acad. Sci.* 804: 86-98.
- Hayashi, T. és Ito, U. (1933): Histological observations of the alluring gland of the female silkmoth. *J. Seric. Sci. Japan.* 4: 308-314.
- Hellman, U., Wernstedt, C., Góñez, J. és Heldin, C-H. (1995): Improvement of an “in-gel” digestion procedure for the micropreparation of internal protein fragments for amino acid sequencing. *Anal. Biochem.* 224: 451-455.
- Hewick, R.M., Hunkapiller, M.W., Hood, L.E. Dreyer, WJ. (1981): A gas-liquid solid-phase peptide and protein sequenator. *J. Biol. Chem.* 256: 7990-7997.
- Hollander, A.L. és Yin, C.M. (1982): Neurological influences on pheromone release and calling behavior in the gypsy moth, *Lymantria dispar* (L.). *Physiol. Entomol.* 7: 163-166.

Hollander, A.L. és Yin, C.M. (1985): Lack of humoral control in calling and pheromone release by brain, corpora cardiaca, corpora allata and ovaries of the female gypsy moth, *Lymantria dispar* (L.). J. Insect Physiol. 31: 159-163.

Holman, G.M., Cook, B.J. és Nachman, R.J. (1986a): Isolation, primary structure and synthesis of a blocked neuropeptide isolated from the cockroach, *Leucophaea maderae*. Comp. Biochem. Physiol. 85C: 219-224.

Holman, G.M., Cook B.J. és Nachman, R.J. (1986b): Isolation, primary structure and synthesis of leucomyosuppressin, an insect neuropeptide that inhibits the spontaneous contractions of the cockroach hindgut. Comp. Biochem. Physiol. 85C: 329-333.

Holman, G.M., Nachman R.J., Schoofs, L., Hayes, T.K., Wright, M.S. és De Loof, A. (1991): The *Leucophaea maderae* hindgut preparation: a rapid and sensitive bioassay tool for the isolation of insect myotropins of other insect species. Insect Biochem. 21: 107-112.

Holman, G. M., Nachman, R. J. és Wright, M. S. (1990): Insect neuropeptides. Annu. Rev. Entomol. 35: 201-217.

Holwerda, D.A., van Dorn, J. és Beenackers, A.M.T. (1977): Characterization of the adipokinetic and hyperglycemic substances from the locust corpus cardiacum. Insect Biochem. 7: 151-157.

Hull, J.J., Ohnishi, A., Moto, K., Kawasaki, Y., Kurata, R., Suzuki, M.G. és Matsumoto, S. (2004): Cloning and characterization of the pheromone biosynthesis activating neuropeptide receptor from the silkworm, *Bombyx mori*. J. Biol. Chem. 279: 51500-51507.

Hull, J.J. Ohnishi, A. és Matsumoto, S. (2005): Regulatory mechanisms underlying pheromone biosynthesis activating neuropeptide (PBAN)-induced internalization of the Bombyx mori PBAN receptor. Biochem. Biophys. Res. Commun. 334: 69-78.

Huybrechts, J., Verleyen, P. és Schoofs, L. (2005): Mass spectrometric analysis of head ganglia and neuroendocrine tissue of larval *Galleria mellonella* (Arthropoda, Insecta). J. Mass Spectrom. 40: 271-276.

Iglesias, F., Marco, P., Francois, M.C. Camps, F. Fabrias, G. és Jacquín-Joly, E.A. (2002): A new member of the PBAN family in *Spodoptera littoralis*: molecular cloning and immunovisualisation in scotophase hemolymph. Insect Biochem. Molec. Biol. 32: 901-908.

Iglesias, F., Marco, P., Jacquín-Joly, E., Camps, F. és Fabrias, G. (1998): Regulation of sex pheromone biosynthesis in two Noctuid species, *S. littoralis* and *M. brassicae*, may involve both PBAN and the ventral nerve cord. Arch. Insect Biochem Physiol. 37: 295-304.

Imai, K. Konno, T., Nakazawa, T., Komiya, T., Isobe, M., Koga, K., Goto, T., Yaginuma, T., Sakakibara, K., Hasegawa, K. és Yamashita, O. (1991): Isolation and structure of diapause hormone of silkworm, *Bombyx mori*. Proc. Japan Acad. 67B: 98-101.

Ishibashi, J., Kataoka, H., Nagasawa, H., Isogai, A. és Suzuki, A. (1992): Isolation and identification of adipokinetic hormone of the silkworm, *Bombyx mori*. Biosci. Biotech. Biochem. 56: 66-70.

Ishizaki, H., Mizoguchi, A., Fujishita, M., Suzuki, A., Moriya, I., Ooka, H., Kataoka, H., Isogai, A., Nagasawa, H., Tamura, S. és Suzuki, A. (1983): Species specificity of the insect Prothoracicotropic hormone (PTTH): the presence of *Bombyx*- and *Samia*-specific PTTHs in the brain of *Bombyx mori*. Dev. Growth Diff. 25: 593-600.

Itagaki, H. és Conner, W.E. (1986): Physiological control of pheromone release behavior in *Manduca sexta* (L.). J. Insect Physiol. 32: 657-664.

Iwanaga, M., Dohmae, N., Fónagy, A., Takio, K., Kawasaki, H., Maeda, S. és Matsumoto, S. (1998): Isolation and characterization of calmodulin in the pheromone gland of the silkworm, *Bombyx mori*. Comp. Biochem. Physiol. 120B: 761-767.

Jacquin-Joly, E., Burnet, M., Francois, M., Ammar, D., Nagnan-le Meillour, P. és Descoins, C. (1998): cDNA cloning and sequence determination of the pheromone biosynthesis activating neuropeptide of *Mamestra brassicae*: A new member of the PBAN family. Insect Biochem. Molec. Biol. 28: 251-258.

Jacquin-Joly, E., Jurenka, R.A., Ljungberg, H., Nagnan, P., Löfstedt, C., Descoins, C. és Roelofs, W.L. (1994): Control of sex pheromone biosynthesis in the moth *Mamestra brassicae* by pheromone biosynthesis activating neuropeptide. Insect Biochem. Molec. Biol. 24: 203-211.

Jaffe, H., Raina, A.K. és Hayes, D.K. (1986a): HPLC isolation and purification of pheromone biosynthesis activating neuropeptide of *Heliothis zea*. In: Borkovec, A.B. és Gelman, D.B. (Eds.) Insect Neurochemistry and Neurophysiology. Humana Press, N.J. pp: 219-224.

Jaffe, H., Raina, A.K., Riley, C.T., Fraser, B.A., Holman, G.M., Wagner, R.M., Ridgway, R.L. és Hayes, D.K. (1986b): Isolation and primary structure of a peptide from the corpora cardiaca of *Heliothis zea* with adipokinetic activity. Biochem. Biophys. Res. Commun. 135: 622-628.

Jefferson, R.N. és Rubin, R.E. (1973): Sex pheromones of Lepidoptera. XXXV. Pupal and postemergence development of the pheromone gland of *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 66: 277-279.

Jeong, S.E., Rosenfield, C-L., Marsella-Herrick, P., You, K.M. és Knipple, D.C. (2003): Multiple acyl-CoA desaturase-encoding transcripts in pheromone glands of *Helicoverpa assulta*, the oriental tobacco budworm. Insect Biochem. Molec. Biol. 33: 609-622.

Jurenka, R.A. (1996): Signal transduction in the stimulation of sex pheromone biosynthesis in moths. Arch. Insect. Biochem. Physiol. 33: 245-258.

Jurenka, R.A., Fabrias, E. és Roelofs, W.L. (1991a): Hormonal control of female sex pheromone biosynthesis in the redbanded leafroller moth *Argyrotaenia velutinana*. Insect Biochem. 21: 81-89.

Jurenka, R.A., Jacquin, E. és Roelofs, W.L. (1991b): Stimulation of pheromone biosynthetic pathway in *Helicoverpa zea*: action of a brain hormone on pheromone glands involves Ca^{++} and cAMP as second messengers. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88: 8621-8625.

Kakluchi, S. és Yamazaki, R. (1970): Calcium dependent phosphodiesterase activity and its activating factor (PAF) from brain. Studies on cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase (III). Biochem. Biophys. Res. Commun. 41: 1104-1110.

Kataoka, H., Tosci, A., Li, J-P., Carney, R-L., Schooley, D.A. és Kramer, S.J. (1989): Identification of an allatotropin from the adult *Manduca sexta*. *Science*. 243: 1481-1483.

Kawano, T., Kataoka, H., Nagasawa, H., Isogai, A. és Suzuki, A. (1992): cDNA cloning and sequence determination of the pheromone biosynthesis activating neuropeptide of the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189: 221-226.

Keeley, L.L. Hayes, T.K., Bradfield, J.Y., és Lee, Y-H. (1991): Metabolic neuropeptides. In: Menn, J.J., Kelly, T.J. és Masler, E.P. (Eds.) *Insect Neuropeptides, Chemistry, Biology and Action*. ACS Symp. Ser. 453: Am. Chem. Soc. Washington, DC. pp: 65-82.

Kim, K-H., Lopez-Casillas, F., Bai, D.H., Luo, X. és Pape, M.E. (1989): Role of reversible phosphorylation of acetyl-CoA carboxylase in long chain fatty acid synthesis. *FASEB J.* 3: 2250-2256.

Kingan, T.G., Teplow, D.B., Phillips, J.M. Riehm, J.P. Ranga Rao, K., Hildebrand, J.G., Homberg, U., Kammer, A.E., Jardine I., Griffin, P.R. és Hunt, D.F. (1990): A new peptide in the FMRFamide family isolated from the CNS of the hawkmoth, *Manduca sexta*. *Peptides*. 11: 849-856.

Kingan, T.G., Raina, A.K., Blackburn, M. és Ma, M. (1992): The distribution of PBAN-like immunoreactivity in the subesophageal ganglion, protocerebrum, and associated neurohemal structures in the corn earworm, *Helicoverpa zea*. *Cell Tissue Res.* 270: 229-240.

Kingan, T.G., Shabanowitz, J., Hunt, D.F. és Witten, J.L. (1996): Characterization of two myotropic neuropeptides in the FMRFamide family from segmental ganglia of the moth *Manduca sexta*: candidate neurohormones and neuromodulators. *J. Exp. Biol.* 199: 1095-1104.

Kino, T., Hatanaka, H., Hashimoto, M., Nishiyama, M., Goto, T., Okuhara, M., Kohsaka, M., Aoki, H. és Imanaka, H. (1987a): FK-506, a novel immunosuppressant isolated from *Streptomyces*. I. Fermentation, isolation and physico-chemical and biological characteristics. *J. Antibiot.* 40: 1249-1255.

Kino, T., Hatanaka, H., Miyata, S., Inamura, N., Nishiyama, M., Yajima, T., Goto, T., Okuhara, M., Kohsaka, M., Aoki, H. és Ochiai, T. (1987b): FK-506, a novel immunosuppressant isolated from *Streptomyces*. II. Immunosuppressive effect of FK-560 *in vitro*. *J. Antibiot.* 4: 1256-1265.

Kitamura, A., Nagasawa, H., Kataoka, H., Inoue, T., Matsumoto, S., Ando, T. és Suzuki, A. (1989): Amino acid sequence of pheromone biosynthesis activating neuropeptide (PBAN) of the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163: 520-526.

Kitamura, A., Nagasawa, H., Kataoka, H., Ando, T. és Suzuki, A. (1990): Amino acid sequence of pheromone biosynthesis activating neuropeptide-II (PBAN-II) of the silkworm, *Bombyx mori*. *Agric. Biol. Chem.* 54: 2495-2497.

Klee, C.B., Draetta, G. és Hubbard. (1987): Calcineurin. *Adv. Enzymol.* 61: 149-200.

Klee, C.B., Krinks, M.H., Mallahan, A.S., Draetta, G.F. és Newton, D.L. (1985): Control of calcineurin protein phosphatase activity. *Adv. Protein Phosphatases*. 1: 135-146.

- Knipple, D.C. Rosenfield, C.-L., Miller, S.J. Liu, W., Tang, J., Ma, P.W.K. és Roelofs, W. L. (1998): Cloning and functional expression of a cDNA encoding a pheromone gland-specific acyl-Co-A Δ^{11} desaturase of the cabbage looper moth, *Trichoplusia ni*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95: 15287-15292.
- Konopińska, D. (1997): Insect neuropeptide proctolin and its analogues. J Peptide Res. 49: 457-466
- Konopińska, D., Sobotka, W., Lesicki, A., Rosinski. G. és Sujak, P. (1986): Synthesis of proctolin analogs modified in the position 2 of peptide chain and their cardioexcitatory effect on the cockroach *Periplaneta americana* and the yellow mealworm *Tenebrio molitor*. Int. J. Peptide Protein Res. 27: 597-603.
- Köllisch, G.V., Verhaert, P.D., Lorenz, M.W., Kellner, R., Gäde, G. és Hoffmann, K.H. (1999): Structure elucidation of Mas-AKH as the major adipokinetic hormone in the butterfly *Vanessa cardui* (Lepidoptera: Nymphalidae). Eur. J. Entomol. 96: 309-315.
- Köllisch, G.V., Lorenz, M.W., Kellner, R., Verhaert, P.D. és Hoffmann, K.H. (2000): Structure elucidation and biological activity of an unusual adipokinetic hormone from corpora cardiaca of the butterfly, *Vanessa cardui*. Eur. J. Biochem. 267: 5502-5508.
- Kopeč, S. (1917): Experiments on metamorphosis of insects. Bull. Int. Acad. Cracovie B. 1917: 57-60.
- Kopeč, S. (1922): Studies on the necessity of the brain for the inception of insect metamorphosis. Biol. Bull. Mar. Biol. Lab. 42: 323-342.
- Kreienkamp, H.J., Larusson, H.J., Witte, I., Roeder, T., Birgül, N., Honck, H.H., Harder, S., Ellinghausen, G., Buck, F. és Richter, D. (2002): Functional annotation of two orphan G-protein-coupled receptors, Drostar1 and -2, from *Drosophila melanogaster* and their ligands by reverse pharmacology. J. Biol. Chem. 277: 39937-39943.
- Kunz, J. és Hall, M.N. (1993): Cyclosporin A, FK 506 and rapamycin: more than just immunosuppression. Trends Biochem. Sci. 18: 334-338.
- Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. Nature. 227: 680-685.
- Lalanne-Cassou, B., Percy, J. és MacDonald, J.A., (1977): Ultrastructure of sex pheromone gland cells in *Lobesia botrana* Den and Schiff. (Lepidoptera: Olethreutidae). Can. J. Zool. 55: 672-680.
- Lee, D-W. és Boo, K.S. (2005): Molecular characterization of pheromone biosynthesis activating neuropeptide from the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). Peptides. 26: 2404-2411.
- Lee, M.L. Goldsworthy, G.J., Poulos, C.P. és Velentza, A. (1996): Synthesis and biological activity of adipokinetic hormone analogues modified at the C-terminus. Peptides. 17: 1285-1290.

- Lee, M.L., Cusinato, O., Luswata, R., Wheeler, C.H. és Goldsworthy, G.J. (1997): N-terminal modifications to AKH-I from *Locusta migratoria*: assessment of biological potencies *in vivo* and *in vitro*. Regul. Peptides. 69: 69-76.
- Lee, M.J., de Jong, S., Gäde, G., Poulos, C. és Goldsworthy, G.J. (2000): Mathematical modelling of insect neuropeptide potencies. Are quantitatively predictive models possible? Insect Biochem. Molec. Biol. 30: 899-907.
- Li, X.J., Wolfgang, W., Wu, Y.N., North, R.A. és Forte, M. (1991): Cloning, heterologous expression and developmental regulation of a *Drosophila* receptor for tachykinin-like peptides. EMBO J. 10: 3221-3229.
- Liebrich, W. és Gäde, G. (1995): Adipokinetic neuropeptides and flight metabolism in three moth species of the families *Sphingidae*, *Saturniidae* and *Bombycidae*. Z. Naturforsch. 50: 425-434.
- Liu, J. (1993): FK 506 and cyclosporine: molecular probes for studying intracellular signal transduction. Trends Pharm. Sci. 14: 182-188.
- Liu, W., Ma, P.W.K., Marsella-Herrick, P., Rosenfield, C.L., Knipple, D.C. és Roelofs, W. (1999): Cloning and functional expression of a cDNA encoding a metabolic acyl-CoA Δ^9 desaturase of the cabbage looper moth *Trichoplusia ni*. Insect Biochem. Molec. Biol. 29: 435-443.
- Ma, P.W., Knipple, D.C. és Roelofs, W.L. (1994): Structural organization of the *Helicoverpa zea* gene encoding the precursor protein for pheromone biosynthesis-activating neuropeptide and other neuropeptides. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91: 6506-6510.
- Ma, P.W.K. és Roelofs, W.L. (1995): Calcium involvement in the stimulation of sex pheromone production by PBAN in the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae). Insect Biochem. Mol. Biol. 25: 467-473.
- Ma, P.W.K. és Roelofs, W.L. (2002): Sex pheromone gland of the female European corn borer moth, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera, Pyralidae): ultrastructural and biochemical evidences. Zool. Sci. 19: 501-511.
- Martinez, T., Fabrias, G. és Camps, F. (1990): Sex pheromone biosynthetic pathway in *Spodoptera littoralis* and its activation by a neurohormone. J. Biol. Chem. 265: 1381-1387.
- Masler, E.P., Raina, A.K., Wagner, R.M. és Kochansky, J.P. (1994): Isolation and identification of a pheromonotropic neuropeptide from the brain-suboesophageal ganglion complex of *Lymantria dispar*: a new member of the PBAN family. Insect Biochem. Molec. Biol. 24: 829-836.
- Matsumoto, S., Fónagy, A., Kurihara, M., Uchiumi, K., Nagamine, T., Chijimatsu M. és Mitsui, T. (1992a): Isolation and primary structure of a novel pheromonotropic neuropeptide structurally related to Leucopyrokinin from the armyworm larvae, *Pseudaletia separata*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 182: 534-539.

- Matsumoto, S., Fónagy, A., Yamamoto, M., Yokoyama, N., Esumi, Y., Suzuki, Y. és Yamaguchi, I. (2002): Chemical characterization of cytoplasmic lipid droplets in the pheromone-producing cells of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 32: 1447-1455.
- Matsumoto, S., Kitamura, A., Nagasawa, H., Kataoka, H., Orikasa, C., Mitsui, T. és Suzuki, A. (1990): Functional diversity of a neurohormone produced by the suboesophageal ganglion: Molecular identity of melanization and reddish colouration hormone and pheromone biosynthesis activating neuropeptide. *J. Insect Physiol.* 36: 427-432.
- Matsumoto, S., Ozawa, R., Nagamine, T., Kim, G-H., Uchiumi, K., Shono, T. és Mitsui, T. (1995): Intracellular transduction in the regulation of pheromone biosynthesis of the silkworm, *Bombyx mori*: suggested involvement of calmodulin and phosphoprotein phosphatase. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59: 560-562.
- Matsumoto, S., Yamashita, O., Fónagy, A., Kurihara, M., Uchiumi, K., Nagamine T. és Mitsui, T. (1992b): Functional diversity of a pheromonotropic neuropeptide: Induction of cuticular melanization and embryonic diapause in lepidopteran insects by *Pseudaletia* pheromonotropin. *J. Insect Physiol.* 38: 847-851.
- Matsumoto, S., Yoshiga, T., Yokoyama N., Iwanaga, M., Koshiha, S., Kigawa, T., Hirota, H., Yokoyama, S., Okano, K., Mita, K., Shimada, T. és Tatsuki, S. (2001): Characterization of acyl-CoA-binding protein (ACBP) in the pheromone gland of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 31: 603-609.
- Mayer, R.J. és Candy, D.J. (1969): Control of haemolymph lipid concentration during locust flight: an adipokinetic hormone from the corpora cardiaca. *J. Insect Physiol.* 15: 611-620.
- Menn, J.J., Kelly, T.J. és Masler, E.P. (Eds). (1991): *Insect neuropeptides; Chemistry, biology and action.* Am. Chem. Soc., Washington D.C. ACS Symposium Series 453: 1-260.
- Miller, T.A. (Ed.) (1980): *Neurohormonal techniques in insects.* Springer-Verlag, New York, Heidelberg, Berlin. pp: 1-282.
- Montague, W. és Cook, J.R. (1971): The role of adenosine 3':5'-cyclic monophosphate in the regulation of insuline release by isolated rat islets of Langerhans. *Biochem. J.* 122: 115-120.
- Moto, K., Suzuki, M. G., Hull, J.J., Kurata, R., Takahashi, S., Yamamoto, M., Okano, K., Imai, K., Ando, T. és Matsumoto, S. (2004): Involvement of a bifunctional fatty-acyl desaturase in the biosynthesis of the silkworm, *Bombyx mori*, sex pheromone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101: 8631-8636.
- Moto, K., Yoshiga, T., Yamamoto, M., Takahashi, S., Okano, K., Ando, T. Nakata, T. és Matsumoto, S. (2003): Pheromone gland-specific fatty-acyl reductase of the silkworm, *Bombyx mori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100: 9156-9161.
- Nagy, B. (1970): Rearing of the European corn borer (*Ostrinia nubilalis* Hbn.) on a simplified artificial diet. *Acta Phytopathol. Hung. Acad. Sci.* 5: 73-79.

Nachman, R.J., Holman, G.M. és Cook, B.J. (1986a) Active fragments and analogs of the insect neuropeptide leucopyrokinin: structure-function studies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 137: 936-942.

Nachman, R.J., Holman, G.M., Haddon, W.F. és Ling, N. (1986b): Leucosulfakinin, a sulfated insect neuropeptide with homology to gastrin and cholecystokinin. *Science*. 234: 71-73.

Nachman, R.J., Olender, E.H., Roberts, V.A., Holman, G.M. és Yamamoto, D. (1996a): A nonpeptidal peptidomimetic agonist of the insect FLRFamide myosuppressin family. *Peptides*. 17: 313-320.

Nachman, R.J., Roberts, V.A., Dyson, H.J., Holman, G.M. és Tainer, J.A. (1991): Active conformation of an insect neuropeptide family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 4518-4522.

Nachman, R.J., Teal, P.E.A., Radel, P., Holman, G.M. és Abernathy, R. L. (1996b): Potent pheromonotropic/ myotropic activity of a carboranyl pseudotetrapeptide analogue of the insect pyrokinin/PBAN neuropeptide family administered via injection or topical application. *Peptides*. 17: 747-752.

Nachman, R.J., Teal, P.E.A. és Ujváry, I. (2001) Comparative topical pheromonotropic activity of insect pyrokinin/PBAN amphiphilic analogs incorporating different fatty and/or cholic acid components. *Peptides*. 22: 279-285.

Nair, M.M., Jackson, G.E. és Gäde, G. (2001): Conformation study of insect adipokinetic hormones using NMR constrained molecular dynamics. *J. Computer-Aided Mol. Design*. 15: 259-270.

Nambu, J.R., Murphy-Erdosh, C., Andrews, P.C., Feistner, G.J. és Scheller, R.H. (1988): Isolation and characterization of a *Drosophila* neuropeptide gene. *Neuron*. 1: 55-61.

Nässel, D. A. (1996): Neuropeptides, amines and amino acids in an elementary insect ganglion: Functional and chemical anatomy of the unfused abdominal ganglion. *Progr. Neurobiol.* 48: 325-420.

Nässel, D. A. (2002): Neuropeptides in the nervous system of *Drosophila* and other insects: multiple roles as neuromodulators and neurohormones. *Progr. Neurobiol.* 68: 1-84.

Nässel, D.R., Passier, P.C.C.M., Elekes, K., Dirckensen, H., Vullings, H.G.B. és Cantera, R. (1995): Evidence that locust tachykinin I is involved in release of adipokinetic hormone from locust corpora cardiaca. *Regul. Peptides*. 57: 297-310.

Nichols, R., Schneuwly, S.A. és Dixon, J.E. (1988): Identification and characterization of a *Drosophila* homologue to the vertebrate neuropeptide cholecystokinin. *J. Biol. Chem.* 263: 12167-12170.

Nokihara, K. (1994): Progress in solid-phase synthesis: practical synthesis of peptides with high efficiency. *Koubunshi*. 43: 611-615.

Orchard, I., Lange, A. B. és Bendena, W. G. (2001): FMRFamide-related peptides: a multifunctional family of structurally related neuropeptides in insects. *Adv. Insect Physiol.* 28: 267-329.

- Orchard, I. és Loghton, B.G. (1981): The neural control of release of hyperlipaemic hormone from the corpus cardiacum of *Locusta migratoria*. Comp. Biochem. Physiol. 68A: 25-30.
- O'Shea, M. és Rayne, R.C. (1992): Adipokinetic hormone: Cell and molecular biology. Experientia. 48: 430-438.
- Oudejans, R.C.H.M., Vroemen, S.F., Jansen, R.F.R., Van der Horst, D.J. (1996): Locust adipokinetic hormones: carrier-independent transport and differential inactivation at physiological concentrations during flight and rest. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93:8654-8659.
- Ozawa, R., Ando, T., Nagasawa, H., Kataoka, H. és Suzuki, A. (1993): Reduction of the acyl group: The critical step in bombykol biosynthesis that is regulated *in vitro* by the neuropeptide hormone in the pheromone gland of *Bombyx mori*. Biosci. Biotech. Biochem. 57: 2144-2147.
- Ozawa, R. és Matsumoto, S. (1996): Intracellular signal transduction of PBAN action in the silkworm, *Bombyx mori*: Involvement of Acyl CoA reductase. Insect Biochem. Molec. Biol. 26: 259-265.
- Ozawa, R., Matsumoto, S., Gil Hah, K., Uchiumi, K., Kurihara, M., Shono, T. és Mitsui, T. (1995): Intracellular signal transduction of PBAN action in lepidopteran insects: inhibition of sex pheromone production by compactin, an HMG CoA reductase inhibitor. Regul. Peptides. 57: 319-327.
- Paemen, L., Tips, A., Schoofs, L., Prost, P., Van Damme, J. és De Loof, A. (1991): Lom-AG-myotropin: A novel myotropic peptide from the male accessory glands of *Locusta migratoria*. Peptides, 12: 7-10.
- Pannabecker, T. és Orchard, I. (1986): Octopamine and cyclic AMP mediate release of adipokinetic hormone I and II from isolated neuroendocrine tissue. Mol. Cell. Endocrinol. 48: 153-159.
- Percy-Cunningham, J.E. és MacDonald, J.A. (1987): Biology and ultrastructure of sex pheromone-producing glands. In: Blomquist, G.J. és Prestwich, G.D., (Eds.) Pheromone Biochemistry. Academic Press, Orlando, Fl: 27-75.
- Percy, J.E. és Weatherston, J. (1974): Gland structure and pheromone production in insects. In: Birch M.C. (Ed.) Pheromones, North Holland Publishing Company, Amsterdam, London: 11-34.
- Pfeiffer, D.R., Taylor, R.W. és Lardy, H.A. (1978): Ionophore A 23187: Cathion binding and transport properties. Annals NewYork Acad. Sci. 307: 402-423.
- Prestwich, G.D és Blomquist, G.J. (Eds) (1987): Pheromone Biochemistry. Academic Press, Orlando. Fl. pp: 1-565.
- Price, D. és Greenberg, M. (1977): Structure of molluscan cardioexcitatory neuropeptide. Science. 189: 670-671.
- Rafaeli, A. (2002): Neuroendocrine control of pheromone biosynthesis in moths. Int. Rev. Cytol. 213: 49-91.

- Rafaeli, A., Hirsch, J., Soroker, V., Kamensky, B. és Raina, A.K. (1991): Spatial and temporal distribution of pheromone biosynthesis activating neuropeptide in *Helicoverpa (Heliothis) armigera* using RIA and *in vitro* bioassay. Arch. Insect Biochem. Physiol. 18: 119-129.
- Rafaeli, A. és Soroker, V. (1989): Cyclic AMP mediation of the hormonal stimulation of ^{14}C -acetate incorporation by *Heliothis armigera* pheromone glands *in vitro*. Physiol. Entomol. 16: 457-461.
- Rafaeli, A., Soroker, V., Hirsch, J., Kamensky, B. és Raina, A. (1993): Influence of photoperiod and age on the competence of pheromone glands and on the distribution of immunoreactive PBAN in *Helicoverpa* spp. Arch. Insect Biochem. Physiol. 22: 169-180.
- Rafaeli, A., Soroker, V., Kamensky, B. és Raina, A.K. (1990): Action of pheromone biosynthesis activating neuropeptide on *in vitro* pheromone glands of *Heliothis armigera* females. J. Insect Physiol. 36: 641-646.
- Raina, A. (1993): Neuroendocrine control of sex pheromone biosynthesis in Lepidoptera. Annu. Rev. Entomol. 38: 329-349.
- Raina A.K. és Gäde, G. (1988): Insect peptide nomenclature. Insect Biochem. 18: 785-787.
- Raina, A.K., Davis, J.C. és Stadelbacher, E.A. (1991): Sex pheromone production and calling in *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae): effect of temperature and light. Environ. Entomol. 20: 1451-1456.
- Raina, A.K., Jaffe, H., Klun, J.A., Ridgway, R.L. és Hayes, D.K. (1987): Characteristics of a neurohormone that controls sex pheromone production in *Heliothis zea*. J. Insect Physiol. 33: 809-814.
- Raina, A. K., Jaffe, H., Kempe, T. G., Keim, P., Blacher, R. W., Fales, H., Riley, C. T., Klun, J. A., Ridgway, R. L. és Hayes, D. K. (1989): Identification of a neuropeptide hormone that regulates sex pheromone production in female moths. Science. 244: 796-798.
- Raina, A.K. és Klun, J.A. (1984): Brain factor control of sex pheromone production in the female corn earworm moth. Science. 225: 531-532.
- Raina, A.K., Wergin, W.P., Murphy, C.A. és Erbe, E.F. (2000) Structural organization of the sex pheromone gland in *Helicoverpa zea* in relation to pheromone production and release. Arthr. Struct. Dev. 29: 343-353.
- Rasmussen, J.T., Faergeman, N.J., Kristiansen, K. és Knudsen, J. (1994): Acyl-CoA binding protein (ACBP) can mediate intermembrane Acyl-CoA transport and donate acyl-CoA for β -oxidation and glycerolipid synthesis. Biochem. J. 299: 165-170.
- Rayne, R.C. és O'Shea, M. (1994): Reconstitution of adipokinetic hormone biosynthesis *in vitro* indicates steps in prohormone processing. Eur. J. Biochem. 219: 781-789.
- Reagan, J.D. (1994): Expression cloning of an insect diuretic hormone receptor: a member of the calcitonin/secretin receptor family. J. Biol. Chem. 269: 9-12.

Reynolds, E.S. (1963): The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17: 208-211.

Riddiford, L.M. (1974): The role of hormones in the reproductive behavior of female wild silk moths. In: Barton Browne L. (Ed.). *Experimental Analysis of Insect Behavior*. Springer Verlag, New York: 278-285.

Riddiford, L.M. és Williams, C.M. (1971): Role of corpora cardiaca in the behavior of saturnid moths I. Release of sex pheromone. *Biol. Bull.* 140: 1-7.

Ridgway, R.L., Inscoc, M.N. és Davis, J.C. (1988): Expanding opportunities for practical use of insect pheromones. *Proc. Belwide Cotton Prod. Res. Conf. Memphis: Natl. Cotton Council*: 203-204

Ryan, R.O. és van der Horst, D.J. (2000): Lipid transport biochemistry and its role in energy production. *Annu. Rev. Entomol.* 45: 233-260.

Sasaki, M., Riddiford, L.M. Truman, J.W. és Moore, J.K. (1983): Reevaluation of the role of corpora cardiaca in calling and oviposition behavior of giant silk moth. *J. Insect Physiol.*, 29: 695-705.

Sato, S., Fukasawa, Y., Yamakawa, Y., Suzuki, T., Miyamura, T. és Masahiro, N. (2002): Proteome analysis of lipid droplet. In: 75th Ann. Meeting of the Jap. Biochem. Soc.

Sato, Y., Oguchi, M., Menjo, N., Imai, K., Saito, H., Ikeda, M., Isobe, M. és Yamashita, O. (1993): Precursor polypeptide for multiple neuropeptides secreted from the subesophageal ganglion of the silkworm *Bombyx mori*: Characterization of the cDNA encoding the diapause hormone precursor and identification of additional peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 3251-3255.

Scharrer, B. (1937): Über sekretorisch tätige Nervenzellen bei wirbellosen Tieren. *Naturwissenschaften* 25: 131-138.

Scharrer, B. (1987): Insects as models in neuroendocrine research. *Ann. Rev. Entomol.* 32: 1-16.

Scharrer, E. (1928): Die Lichtempfindlichkeit blinder Elritzen (Untersuchungen über das Zwischenhirn der Fische). *Z. Vgl. Physiol.* 7: 1-38.

Schoofs, L. (1988): Characterization of myotropins, proopiomelanocortin- and neuropeptide tyrosine-related peptides in the migratory locust, *Locusta migratoria*. Proefschrift tot het behalen van de graad van Doctor in de Wetenschappen, (KUL, Leuven). pp: 1-302.

Schoofs, L., Holman, G. M., Hayes, T. K., Nachman, R. J. és De Loof, A. (1990a): Locustatachykinin I and II, two novel insect neuropeptides with homology to peptides of the vertebrate tachykinin family. *FEBS Lett.* 261: 397-401.

Schoofs L., Holman G.M., Hayes T.K., Nachman R.J. és De Loof, A. (1990b): Isolation, identification and synthesis of locustamyotropin II, an additional neuropeptide of *Locusta migratoria*: Member of the cephalomyotropic peptide family. *Insect Biochem.* 20: 479-484.

Schoofs, L., Holman, G.M., Hayes, T.K., Tips, A., Nachman, R.J., Vandesande, F. és De Loof, A. (1990c) Isolation, identification and synthesis of locustamyotropin (Lom-MT), a novel biologically active insect neuropeptide. *Peptides*. 11: 427-433.

Schoofs, L., Holman, G. M., Nachman, R. N., Hayes, T. K. és De Loof, A. (1994): Structure, function, and distribution of insect myotropic peptides. In: Davey, K. D., Peter, R. E. és Tobe, S. S. (Eds.). *Perspectives in Comparative Endocrinology*. Natl. Res. Council. Can. Ottawa: 155-165.

Seamon, K.B., Padgett W. és Daly, J.W. (1981): Forskolin: an unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and insect cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78: 3363.

Shapiro, J.P., Law, J.H. és Wells, M.A. (1988): Lipid transport in insects. *Ann. Rev. Entomol.* 33: 297-318.

Shorey, H.H., Gaston, L.K. és Jefferson, R.N. (1968): Insect sex pheromones. *Adv. Pest Control Res.* 8: 57-126.

Smith, W.A. (1995): Regulation and consequences of cellular changes in the prothoracic glands of *Manduca sexta* during the last larval instar: a review. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 30: 271-293.

Smith, V.L., Doyle, K.E., Maune, J.F., Munjaal, R.P. és Beckingham, K. (1987): Structure and sequence of the *Drosophila melanogaster* calmodulin gene. *J. Mol. Biol.* 196: 471-485.

Soroker, V. és Rafaeli, A. (1989): *In vitro* hormonal stimulation of acetate incorporation by *Heliothis armigera* pheromone glands. *Insect Biochem.* 19: 1-5.

Soroker, V. és Rafaeli, A. (1995): Multi-signal transduction of the pheromonotropic response by pheromone gland incubations of *Helicoverpa armigera*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 25: 1-9.

Stanley-Samuelson, D.W., Jurenka, R.A., Cripps, C., Blomquist, G.J. és deRenobales, M. (1988): Fatty acids in insects: Composition, metabolism and biological significance. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* 9: 1-33.

Starratt, A. N. és Brown, B.E. (1975): Structure of pentapeptide proctolin, a proposed neurotransmitter in insects. *Life Sci.* 17: 1253-1256.

Staubli, F., Jørgensen, T.J.D., Cazzamali, G., Williamson, M., Lenz, C., Søndergaard, L., Roepstorff, P. és Grimmlikhuijzen, C.J.P. (2002): Molecular identification of the insect adipokinetic hormone receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 3446-3451.

Stay, B., Tobe, S. S. és Bendena, W. G. (1994): Allatostatins: Identification, primary structures, functions and distribution. *Adv. Insect Physiol.* 25: 267-337.

Steinbrecht, R.A. (1964): Feinstruktur und Histochemie der Sexualduftdrüse des Seidenspinners *Bombyx mori* L. *Z. Zellforsch. Micr. Anat.* 64: 227-267.

Steele, J.E. (1961): Occurrence of a hyperglycaemic factor in the corpus cardiacum of an insect. *Nature*. 192: 680-681.

- Strand, F. L. (1999): Neuropeptides. Regulators of physiological processes, Bradford Book, MIT Press, Cambridge, Massachusetts, London pp: 1-658.
- Stone, J. V., Mordue, W., Batley, K. E. és Morris, H. R. (1976): Structure of locust adipokinetic hormone, a neurohormone that regulates lipid utilization during flight. *Nature*. 263: 207-211.
- Syu, L.-J. és Saltiel, A.R. (1999): Lipotransin: A novel docking protein for hormone-sensitive lipase. *Molec. Cell*. 4: 109-115.
- Székács, A., Fónagy, A., Fekete, G., Szentkirályi, F. és Bernáth, B. (2004): Ökotoxikológiai és rovarmonitorozási vizsgálatok az agroökológia szolgálatában. „Agro-21” füzetek. 37: 146-159.
- Takagi, T., Nemoto, T., Konishi, K., Yazawa, M. és Yagi, K. (1980): The amino acid sequence of the calmodulin obtained from the sea anemone (*Metridium senile*) muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 96: 377-381.
- Tamaki, Y. (1985): Sex pheromones. In: Kerkut, G.A és Gilbert, L.I. (Eds). *Comprehensive Insect Physiology and Pharmacology*. Pergamon Press, Oxford. Vol. 9: 145-191.
- Tang, J.D., Charlton, R.E., Cardé, R.T. és Yin, C.M. (1987): Effect of allatectomy and ventral nerve cord transection on calling, pheromone emission and pheromone production in *Lymantria dispar*. *J. Insect Physiol.* 33: 469-476.
- Tang, J.D., Charlton, R.E., Jurenka, R.A., Wolf, W.A., Phelan, P.L., Sreng, L. és Roelofs, W.L. (1989): Regulation of pheromone biosynthesis by a brain hormone in two moth species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 1806-1810.
- Teal, P.E.A. és Nachman, R.J. (1994): Separation of neuropeptides by inverse gradient reversed-phase liquid chromatography on a bonded phenyl support. *Anal. Biochem.* 221: 422-425.
- Teal, P.E.A. és Nachman, R.J. (1997): Prolonged pheromonotropic activity of pseudopeptide mimics of insect pyrokinin neuropeptides after topical application or injected into a moth. *Reg. Peptides*. 72: 161-167.
- Teal, P.E.A. és Tumlinson, J.H. (1989): Isolation, identification and biosynthesis of compounds produced by male hairpencil glands of *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Chem. Ecol.* 15: 413-417.
- Teal, P.E.A., Oostendorp, A. és Tumlinson, J.H. (1993): Induction of pheromone production in females of *Heliothis virescens* (F.) and *H. subflexa* (Gn.) (Lepidoptera: Noctuidae) during the photophase. *Can. Entomol.* 153: 355-366.
- Teal, P.E.A., Tumlinson, J.H. és Oberlander, H. (1989): Neural regulation of sex pheromone biosynthesis in *Heliothis* moths. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 2488-2492.
- Teal, P.E.A., Tumlinson, J.H. és Oberlander, H. (1990): Endogenous suppression of pheromone production in virgin female moths. *Experientia*. 46: 1047-1050.

- Tips, A. Paemen, L., Schoofs, L., Ma, M., Blackburn, M. és De Loof, A. (1992): Co-localization of locustamyotropin- and pheromone biosynthesis activating neuropeptide-like immuno-reactivity in the central nervous system of five insect species. *Comp. Biochem. Physiol.* 106A: 195-207.
- Toda, H., Yazawa, M., Kondo, K., Honma, T., Narita, K. és Yagi, K. (1981): Amino acid sequence of calmodulin from scallop (*Patinopecten*) adductor muscle. *J. Biochem.* 90: 1493-1505)
- Tomer, K.B., Crow, F.W. és Gross, M.L. (1983): Location of double bond position in unsaturated fatty acids by negative ion MS/MS. *J. Amer. Chem. Soc.* 105: 5487-5488.
- Towbin, H., Staehelin, T. és Gordon, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and application. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76: 4350-4354.
- Tsuchida, K., Arai, M., Tanaka, Y., Ishihara, R., O.Ryen, R és Maekawa, H. (1998): Lipid transfer particle catalyzes transfer of carotenoids between lipophorins of *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 28: 927-934.
- Tsuchida, K., Soulages, J.L., Moribayashi, A., Suzuki, K., Maekawa, H. és Wells, M.A. (1997): Purification and properties of lipid transfer particle from *Bombyx mori*: Comparison to the lipid transfer particle from *Manduca sexta*. *Biochem. Biophys. Acta.* 1337: 57-65.
- Ujváry, I. (2006): The importance of natural products in insect control. *Pestiycydy/Pesticides.* (in press).
- Veenstra, J.A. és Costes, L. (1999): Isolation and identification of a peptide and its cDNA from the mosquito *Aedes aegypti* related to *Manduca sexta* allatotropin. *Peptides.* 20: 1145-1151.
- Verhaert, P., Uttenweiler-Joseph, S., De Vries, M., Loboda, A., Ens, W. és Standing, K.G. (2001): Matrix-assisted laser desorption/ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry: an elegant tool for peptidomics. *Proteomics.* 218-225.
- Waku, Y. és Sumimoto, K. (1969): Ultrastructure and secretory mechanism of the alluring gland cell in the silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae). *Appl. Entomol. Zool.* 4: 135-146.
- Watterson, D.M., Sharief, F. és Vanaman, T.C. (1980): The complete amino acid sequence of the Ca^{++} -dependent modulator protein (calmodulin) of bovine brain. *J. Biol. Chem.* 255: 962-975.
- Weiss, G.B. (1974): Cellular pharmacology of lanthanum. *Annu. Rev. Pharmacol.* 14: 343-354.
- Wigglesworth, V. B. (1934): Factors controlling moulting and “metamorphosis” in an insect. *Nature.* 133: 725-726.
- Wigglesworth, V. B. (1935) Functions of the corpus allatum of insects. *Nature.* 136: 338-345.
- Williams, C. M. (1956): The juvenile hormone of insects. *Nature.* 178: 212-213.

- Wolf, W.A. és Roelofs, W.L. (1983): A chain shortening reaction in orange tortrix moth sex pheromone biosynthesis. *Insect Biochem.* 13: 375-379.
- Wolf, W.A. és Roelofs, W.L. (1986): Properties of the $\Delta 11$ -desaturase enzyme used in cabbage looper moth sex pheromone biosynthesis. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 3: 45-52.
- Yokoyama, N., Fónagy, A., Tatsuki, S., Arie, T., Yamashita, S. és Matsumoto, S. (2003): Ultrastructural studies on the pheromone producing cells in the silkmoth *Bombyx mori*: formation of cytoplasmic lipid droplets before adult eclosion. *Acta Biol. Acad. Sci. Hung.* 54: 299-311.
- Yoshiga, T., Okano, K., Mita, K., Shimada, T. és Matsumoto, S. (2000): cDNA cloning of acyl-CoA desaturase homologs in the silkworm, *Bombyx mori*. *Gene.* 246: 339-345.
- Yoshiga, T., Yokoyama, N., Imai, N., Ohnishi, A., Moto, K. és Matsumoto, S. (2002): cDNA cloning of calcineurin heterosubunits from the pheromone gland of the silkmoth, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 32: 477-486.
- Ziegler, R., Cushing, A.S., Walpole, P., Jasensky, R.D. és Morimoto, H. (1998): Analogs of *Manduca* adipokinetic hormone tested in a biotest and in a receptor-binding assay. *Peptides.* 19: 481-486.
- Ziegler, R., Eckart, K., Schwarz, H. és Keller, R. (1985): Amino acid sequence of *Manduca sexta* adipokinetic hormone elucidated by combined fast atom bombardment (FAB)/ tandem mass spectrometry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 133: 337-342.
- Ziegler, R., Jasensky, R.D. és Morimoto, H. (1995): Characterization of the adipokinetic hormone receptor from the fat body of *Manduca sexta*. *Reg. Peptides.* 57: 329-338.
- Zöllner, N. és Kirsch, K. (1962): Über die quantitative Bestimmung von Lipoiden (Mikromethode) mittels der vielen natürlichen Lipoiden (allen bekannten Plasmalipoiden) gemeinsamen Sulfophospho-vanillin-Reaktion. *Z. Ges. Exp. Med.* 135: 545-561.

XII. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

<i>AC</i>	Adenilát-cikláz
<i>ACBP</i>	Acil- <i>CoA</i> kötő fehérje
<i>AcCoA</i>	acetyl koenzim-A
<i>AcNi</i>	Acetonitril
<i>ACR</i>	Acil- <i>CoA</i> -reduktáz
<i>ACS</i>	Acil- <i>CoA</i> -szintetáz
<i>-ADH</i>	Antidiuretikus hormon (vagy hatás)
<i>-AKH</i>	Adipokinetikus hormon (vagy hatás)
<i>AMP</i>	Adenozin-monofoszfát
<i>-AST</i>	Allatosztatikus hormon (vagy hatás)
<i>AT</i>	Acil-transzferáz
<i>-AT</i>	Allatotropikus hormon (vagy hatás)
<i>AUFS</i>	Elnyelés egysége a teljes skálán
<i>-AVP</i>	Arginin-vasopresszin hormon
<i>BBC-NBA</i>	Fej-láb ciklizáláson alapuló antagonist
<i>BI</i>	Bazális betűrődés
<i>BL</i>	Bazális lamina
<i>Bztc</i>	Benzetónium klorid
<i>CA</i>	Corpus allatum
<i>CaM</i>	Ca ⁺⁺ -kalmodulin komplex
<i>cAMP</i>	ciklikus adenozin-monofoszfát
<i>CaN</i>	Kalcineurin/Foszfopriotein-foszfataáz(2B)
<i>-CAH</i>	Szívfrekvenciát fokozó hormon
<i>-CAP</i>	Szív működést fokozó peptid
<i>Cbe</i>	2-karboránecetsav
<i>CC</i>	Corpus cardiacum
<i>-CCK</i>	Gasztrin-kolecisztokinin
<i>cDNS</i>	Klónozott dezoxiribonukleinsav
<i>cGMP</i>	ciklikus guanozil-monofoszfát
<i>CHAPS Sup.</i>	3-(kloramidopropil-dimethylammóni)-1-propánszulfonát felülűző
<i>CoA</i>	Koenzim-A
<i>CRF</i>	Kortikotropin-kibocsátási faktor
<i>CsA</i>	Cyclosporin-A (<i>CaN</i> inhibítor)
<i>dbcAMP</i>	dibutiril ciklikus adenozin-monofoszfát
<i>Dg</i>	Diglicerid
<i>-DH</i>	Diapauza hormon
<i>DMSO</i>	Dimethylsulfoxil
<i>-DP</i>	Diuretikus peptid (vagy hatás)
<i>-EDNH</i>	Tojásfejlődést serkentő hormont
<i>-EH</i>	Eklóziós hormon
<i>ELISA</i>	Enzim kapcsolt immunabszorpciós próba
<i>ELSD</i>	Porlasztásos fényszórásos detektor
<i>-ETH</i>	Vedlést beindító hormon
<i>EtOH</i>	Ethanol
<i>Fa</i>	Zsírsav

<i>FaS</i>	Zsírsav-szintetáz
<i>FAB-MS</i>	Gyors atom bombázásos tömegspektrometria
<i>FaRP</i>	FMRF-típusú (végződésű) peptid
<i>FLC</i>	Foszfolipáz-C
<i>FLRFamidok</i>	Phe-Leu-Arg-Phe-amid
<i>FK 506</i>	Immunszuppresszív molekula kódja (<i>CaN</i> inhibitor)
<i>Fmoc</i>	Fast moc (peptid szintézis eljárás)
<i>FMRFamid</i>	Phe-Met-Arg-Phe-amid
<i>FXPRLamid</i>	Phe-(X=Thr;Val;Ser)-Pro-Arg-Leu-amid (C-terminális)
<i>GC</i>	Gázkromatográfia
<i>GLPh</i>	Glikogén-foszforiláz
<i>GMP</i>	Guanozil-monofoszfát
<i>Gp</i>	Guanozil-trifoszfát függő/kapcsolt protein
<i>GTP</i>	Guanozil-trifoszfát
<i>HDLf</i>	Magas fajsúlyú lipoforin
<i>HFBA</i>	Heptafluorvajsav
<i>HGH</i>	Hipoglikémikus hormon
<i>HPLC</i>	Magasnyomású folyadékkromatográfia
<i>-HoTH</i>	Hipotrehalozémikus hormon (vagy hatás)
<i>-HrTH</i>	Hipertrehalozémikus hormon (vagy hatás)
<i>-ITP</i>	Víz/ion visszaszívásért felelős peptid
<i>JH</i>	Juvenilhormon
<i>JHE</i>	Juvenilhormon-észteráz
<i>-K</i>	Kinin peptid
<i>L</i>	Lipáz
<i>Lf</i>	Lipoforin
<i>LD</i>	Lipidcsepp
<i>LDAP</i>	Lipidcsepphez kapcsolódó fehérje
<i>LDLf</i>	Alacsony fajsúlyú lipoforin
<i>L:D</i>	Fény:sötét
<i>LTP</i>	Lipid-transzfer rész
<i>MALDI-ToF MS</i>	Mátrixközvetített lézerdeszorpciós repülésidő tömegspektrometria
<i>MeOH</i>	Methanol
<i>Mg</i>	Monoglicerid
<i>-MIP</i>	Mioinhibitor peptid (vagy hatás)
<i>MIX</i>	3-isobutil-1-methylxanthin
<i>-MK</i>	Miokinin peptid
<i>-MRCH</i>	Melanizációt és vörös pigmentációt serkentő hormon
<i>MS</i>	Tömegspektrometria
<i>-MS</i>	Mioszuppresszív hormon (vagy hatás)
<i>Mt</i>	Mitokondrium
<i>-MT</i>	Miotropikus hormon (vagy hatás)

<i>Mv</i>	Mikrovillus
<i>Ns</i>	Neuroszekréciós sejt
<i>NCC</i>	Corpus cardiacum ideg
<i>-OEH</i>	Ovárium ekdiszteroidogenikus hormon
<i>-OMP</i>	Ováriumérési peptid
<i>-OSH</i>	Oosztatikus (antigonadotropikus) hormon
<i>-PBAN</i>	Feromon bioszintézist serkentő hormon
<i>PBS</i>	Foszfát pufferolt sóoldat
<i>PG</i>	Feromonmirigy
<i>PhK</i>	Foszforiláz-kináz
<i>PK</i>	Protein-kináz
<i>-PK</i>	Pirokinin peptid
<i>PMSF</i>	Fenil-metil-szulfonil fluorid
<i>PP(2B)</i>	Fosztopriotein-foszfátáz(2B)/kalcineurin
<i>PSO</i>	Periszimpatetikus szerv
<i>-PT</i>	Feromonotropikus hormon (vagy hatás)
<i>PTG</i>	Előtori mirigy
<i>PTH</i>	Feniltiohiodantoin
<i>-PTSP</i>	Prothoracikosztatikus hormon
<i>-PTTH</i>	Prothoracikotropikus hormon
<i>r</i>	Receptor
<i>Rh</i>	Relatív páratartalom
<i>RP</i>	Reverz/fordított fázisú
<i>-RPCH</i>	Vörös pigmentációt serkentő hormon
<i>S</i>	Elektrodenz struktúrák (vezikulumok)
<i>SDS-PAGE</i>	Nátrium-dodecil-szulfát poliakril gélelektroforézis
<i>sER</i>	Sima endoplazmatikus retikulum
<i>-SK</i>	Szulfakinin peptid
<i>SOG</i>	Garatalatti dúc
<i>SPE</i>	Szilárd fázisú kivonás
<i>TBS</i>	Tris Buffered Saline
<i>TE</i>	Tesztikuláris ekdiziotropin
<i>TFA</i>	Trifluórecetsav
<i>TFP</i>	Trifluoperazin
<i>Tg</i>	Triglicerid
<i>TgL</i>	Triglicerid-lipáz
<i>-TK</i>	Tahikinin peptid
<i>TKY(FSPRL)amid</i>	Szintetikus rövid FXPRLamid peptid
<i>TLC</i>	Vékonyréteg kromatográfia
<i>-TMOF</i>	Tripszin mennyiségét befolyásoló faktor
<i>UV</i>	Ultraibolya
<i>V</i>	Vezikulum

Megjegyzés: Egybetűs aminosav kódokat lsd. a 11. oldalon.

Rovar fajlista és a nevekhez tartozó -a dolgozatban (esetenként) használt- rövidítések:

Acd	<i>Acheta domesticus</i>
Agi	<i>Agrotis ipsilon</i>
Anp	<i>Antheraea polyphemus</i>
Arv	<i>Argyrotaenia velutinana</i>
Blc	<i>Blaberus craniifer</i>
Bom	<i>Bombyx mori</i>
Cav	<i>Calliphora vomitoria</i>
Chc	<i>Chrysodeixis chalcites</i>
Dip	<i>Diploptera punctata</i>
Drm	<i>Drosophila melanogaster</i>
Gam	<i>Galleria mellonella</i>
Hea	<i>Heliocoverpa armigera</i>
Hep	<i>Heliothis peltigera</i>
Hes	<i>Heliothis assulta</i>
Hev	<i>Heliothis virescens</i>
Hez	<i>Helicoverpa zea</i>
Hyc	<i>Hyalophora cecropia</i>
Lem	<i>Leucophaea maderae</i>
Lom	<i>Locusta migratoria</i>
Lyd	<i>Lymantria dispar</i>
Mab	<i>Mamestra brassicae</i>
Mas	<i>Manduca sexta</i>
Neb	<i>Neobellieria bullata</i>
Osn	<i>Ostrinia nubilalis</i>
Pas	<i>Pachnodea sinuata</i>
Pea	<i>Periplaneta americana</i>
Pss	<i>Pseudaletia separata</i>
Psu	<i>Pseudaletia unipuncta</i>
Rhp	<i>Rhodnius prolixus</i>
Scd	<i>Scarabeus deludens</i>
Scg	<i>Schistocerca gregaria</i>
Spl	<i>Spodoptera litura</i>
Trn	<i>Trichoplusia ni</i>
Vac	<i>Vanessa cardui</i>